



Modélisation du métabolisme énergétique tumoral glycolytique vs. respiratoire oxydatif

Loïs Naudin

► To cite this version:

Loïs Naudin. Modélisation du métabolisme énergétique tumoral glycolytique vs. respiratoire oxydatif. Mathématiques [math]. 2018. hal-01980569

HAL Id: hal-01980569

<https://inria.hal.science/hal-01980569>

Submitted on 14 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

SORBONNE UNIVERSITÉ

Loïs NAUDIN

Rapport de Stage

MODÉLISATION DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE TUMORAL
GLYCOLYTIQUE VS. RESPIRATOIRE OXYDATIF

Septembre 2018

Organisme d'accueil :
INRIA MAMBA, Paris
Laboratoire d'accueil :
JACQUES LOUIS LIONS

Directeurs de stage :
Jean CLAIRAMBAULT
Diane PEURICHARD



A propos d'une population de chasseurs-cueilleurs sur l'île de Kitava dont l'alimentation est très proche de celle que nous avons au paléolithique et dont le mode de vie dans son ensemble a été préservé de l'influence des pays industrialisés :

”Aucun habitant n'est en surpoids, aucun ne souffre d'hypertension artérielle, de diabète, d'accident vasculaire cérébral, d'ostéoporose, de maladie auto-immune ni d'acné, pas même chez les jeunes de moins de 25 ans¹”.

PALÉONUTRITION, p.11 - Julien Venesson

1. Carrera-Bastos P, Fontes Villalba M, O'Keefe JH, Lindeberg S, Cordain L. *The western diet and lifestyle and diseases of civilization*. Res Rep Clin Cardiol 2011 ;2 :215-235

Table des matières

1	Quelques faits biologiques importants	7
1.1	Voies énergétiques : différences entre cellule saine et cancéreuse .	7
1.1.1	Glycolyse	8
1.1.2	Effet Warburg	9
1.2	Facteur induit par l'hypoxie HIF	11
1.3	Compétition pour le glucose	12
1.4	Systèmes de régulations du pH intracellulaire	13
1.4.1	Caractérisation des mécanismes de régulation du pHi . . .	13
1.4.2	Adaptations des mécanismes de régulations du pHi en réponse au flux glycolytique augmenté	15
1.5	Utilisation du lactate	17
1.6	Stratégies possibles contre les cellules cancéreuses	19
2	Modèle EDO Lotka-Volterra	20
2.1	Cadre et hypothèses de la modélisation	21
2.1.1	Expression de la fonction ϕ déterminant le phénotype . .	21
2.1.2	Expression des taux de prolifération	22
2.1.3	Expression des capacités maximales d'accueil	23
2.1.4	Coefficients de compétition pour le glucose	23
2.2	Étude du modèle Lotka-Volterra avec taux d'oxygène constant .	25
2.2.1	Étude théorique	25
2.2.2	Résultats numériques	28
2.3	Compétition avec stochasticité de l'oxygène	29
2.4	Modèle EDO Lotka-Volterra avec compétition et coopération . .	31
2.4.1	Détermination du nombre de lactate produits au temps t	31
2.4.2	Détermination du nombre de lactate consommé au temps t	32
2.4.3	Résultats théoriques	33
2.4.4	Résultats numériques	34
2.5	Limites de notre modèle	34

3	EDP structurée en phénotype	35
3.1	Modélisation du taux de de prolifération	37
3.2	Équation Intégro Différentielle (sélection)	38
3.2.1	Résultats théoriques	38
3.2.2	Résultats numériques	40
3.3	Terme de mort dépendant du pH	42
3.3.1	Détermination de l'expression de la fonction $d(x, h)$	42
3.3.2	Résultats numériques	43
3.4	Ajout d'un terme modélisant la compétition pour l'accès au glucose	45
3.5	Ajout d'un terme thérapeutique	45
3.5.1	Simulations numériques terme de transport	47
3.5.2	Simulations numériques terme de transport + sélection . .	49
A	Détails de la construction de la fonction $d(x, h)$	52
B	Code numérique Lotka-Volterra EDO	55
B.1	Lotka-Volterra compétition avec taux d'oxygène constant	55
B.2	Avec la fonction ODE	56
B.3	Avec une méthode Runge-Kutta d'ordre 4	57
B.4	Lotka-Volterra compétition avec stochasticité de l'oxygène	58
C	Code numérique EDP structurée	59
C.1	Schéma numérique terme de sélection	60
C.2	Schéma numérique terme de sélection avec terme de mort	61
C.3	Schéma numérique terme de sélection avec terme de mort + terme de compétition	62
C.4	Implémentation schéma numérique terme de transport	63
C.5	Implémentation schéma numérique de splitting pour terme de transport + sélection	64

Introduction

Le cancer, dans les sociétés occidentales, est devenu la première cause de mortalité en dépit des progrès constants dans la compréhension des mécanismes sous-jacents et des thérapies. Au niveau mondial, il représente la seconde cause de mortalité en étant responsable de 8.8 millions de morts en 2015 (correspondant à près d'une mort sur six) [3].

	France (2009)	USA (2010)
Cancer	30 %	23 %
Heart diseases	21 %	24 %
Chronic lower respiratory	6 %	6 %
CVA	6 %	5 %

FIGURE 1 – Causes de mortalité en France et aux USA (tirée de [19]).

Quelques chiffres montrent l'importance et l'impact du cancer [19] :

- 1600 Américains meurent tous les jours d'un cancer.
- Depuis 2004, le cancer est la première cause de mortalité en France (34% d'hommes, 25% de femmes).
- En France, le nombre de cancers a augmenté de 20% entre 1980 et 2000.

Ces faits et chiffres montrent l'impératif d'approfondir l'étude du fonctionnement des cellules cancéreuses et, pour ce faire, le *modèle mathématique* semble aujourd'hui un outil d'une grande puissance. En effet, il nous offre une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à un phénomène en permettant de **tester** des hypothèses biologiques contre des données expérimentales et, de cette manière, d'en affirmer ou rejeter la pertinence. Aussi il permet de **prédire**, à l'aide de simulations numériques, l'évolution de la maladie ou l'impact d'une thérapie sur une tumeur.

Dans un premier temps nous tâcherons d'explicitier et de décrire les mécanismes fondamentaux du cancer et des cellules cancéreuses, qui nous serviront alors tout au long de notre travail de modélisation. Entre autres, nous définirons ce qu'est une cellule au phénotype Warburg et Pasteur, nous présenterons les facteurs induits par l'hypoxie permettant aux cellules de s'adapter à un manque d'oxygène au sein de la tumeur, les systèmes de régulations du pH intracellulaire, le mécanisme par lequel les cellules Pasteur oxygénées de la tumeur recyclent le lactate produit par les cellules Warburg...

En section 2 nous étendrons le modèle Lotka-Volterra *discret* proposé par Gravenmier et Gatenby dans [5] qui modélisent deux populations de cellules structurées en phénotypes (Warburg et Pasteur) en compétition pour l'accès au glucose, en un modèle *continu* EDO à partir duquel nous retrouverons, après

analyse, leurs résultats. Nous proposerons aussi des expressions des taux de prolifération qui n'étaient pas explicites dans [5] en nous basant sur des arguments métaboliques similaires à ceux utilisés par Granvemier et Gatenby. Nous effectuerons alors une analyse mathématique du modèle continu pour justifier rigoureusement les résultats selon lesquels en condition extrême d'oxygène les cellules Warburg dominent alors que les cellules Pasteur sont sélectionnées pour toutes les autres conditions intermédiaires (voir section 2.2 et plus précisément le théorème 2.1), ainsi que la sélection des cellules Warburg lorsque l'*amplitude* des fluctuations en oxygène est assez grande (voir section 2.3). Ensuite nous étendrons encore, en section 2.4, le modèle en prenant en compte le mécanisme de recyclage du lactate par les cellules Pasteur oxygénées de la tumeur, de telle manière que la compétition pour l'accès au glucose diminue et qu'une coexistence des deux populations s'installe, seulement en condition extrême d'oxygène (voir proposition 2.1).

Cependant, comme le note Gravenmier et Gatenby, ne considérer seulement que deux phénotypes de cellules composant une tumeur est une trop grande simplification. En réalité nous observons une diversité de phénotypes variant du phénotype Warburg au phénotype Pasteur. Ainsi nous proposerons en section 3 une EDP structurée en phénotype qui codera toute la variabilité phénotypique d'une population de cellules, et qui se voudra être une généralisation du modèle EDO de la section 2. Plus précisément, il se voudra être plus qu'une généralisation car nous prendrons en compte le rôle du pH dans l'apoptose des cellules. Nous considérerons aussi l'action d'une drogue thérapeutique qui poussera les cellules à adapter leur phénotype suite au stress cellulaire induit par celle-ci.

1 Quelques faits biologiques importants

1.1 Voies énergétiques : différences entre cellule saine et cancéreuse

Définissons tout d'abord ce qu'est le métabolisme.

Définition 1.1 (Métabolisme). *Le métabolisme est l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent au sein d'un être vivant pour lui permettre notamment de se maintenir en vie, de se reproduire, de se développer et de répondre aux stimuli de son environnement. Il est composé de deux mécanismes opposés :*

- le **catabolisme** : il permet d'extraire l'énergie des nutriments, par dégradation des molécules énergétiques (glucides, lipides...);
- l'**anabolisme** : il permet de synthétiser les constituants nécessaires à la structure et au bon fonctionnement des cellules.

On peut donc définir le métabolisme *énergétique* comme l'ensemble des réactions chimiques, au sein d'une cellule, produisant de l'énergie, de l'ATP. Il y a principalement deux voies métaboliques, dans une cellule saine, pour produire de l'ATP : la *respiration mitochondriale* en présence d'oxygène, et la *fermentation* en absence de celui-ci (voir figure 2). Le point de départ commun aux deux voies est la glycolyse. Celle-ci joue un rôle fondamental dans le développement du cancer et sa progression, comme nous le verrons plus loin. Définissons-la rigoureusement.

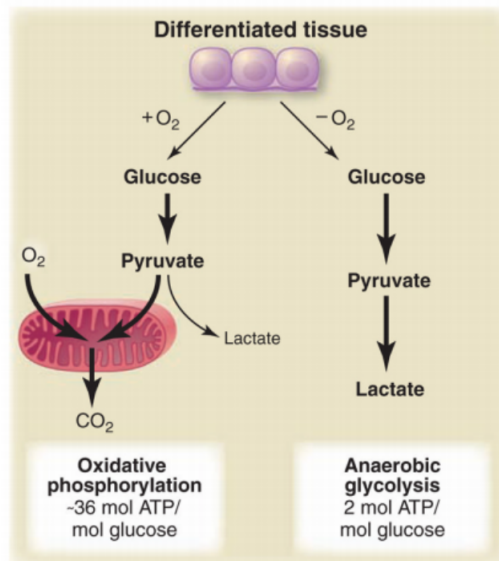


FIGURE 2 – Deux voies d'utilisations possibles du glucose en fonction de l'environnement : *Respiration mitochondriale* en présence d'oxygène (à gauche) ou *fermentation* (glycolyse anaérobie) en absence d'oxygène (à droite)

1.1.1 Glycolyse

Au sein de la cellule, le glucose, transporté à l'intérieur de celle-ci par des transporteurs membranaires **GLUT**, n'est pas directement utilisable, il doit être dégradé : c'est le rôle de la **glycolyse**. Etymologiquement le terme de glycolyse dérive de la racine grecque "GLYK" qui signifie "sucré" et "LYSIS" qui signifie "dissolution". La glycolyse est donc la voie métabolique dégradant le glucose en **pyruvate** et au terme de laquelle sont générés, entre autres, **deux ATP**. Elle se déroule dans le cytosol de la cellule et correspond à un ensemble de dix réactions chimiques. Nous allons ici nous concentrer à décrire deux de ses dix réactions (la première et la troisième) car les enzymes catalysant ces deux réactions jouent un rôle dans le contrôle du flux glycolytique et donc, par extension, dans le développement du cancer :

- La première réaction consiste en la phosphorylation² d'un glucose en glucose-6-phosphate (G-6-P) à l'aide d'une **hexokinase**³ (**HK**). La phosphorylation a deux conséquences :
 1. Augmentation de la réactivité chimique du glucose.
 2. Séquestration du glucose dans le cytosol : sa sortie par le transporteur GLUT n'est plus possible ainsi que son passage par la membrane plasmique de la cellule car cette dernière est hydrophobe aux molécules phosphorylées.
- La troisième réaction consiste en la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate (la deuxième réaction ayant isomérisé le G-6-P en fructose-6-phosphate) à l'aide de la **phosphofructokinase** (**PFK**). Nous renvoyons au premier chapitre de [13] pour une présentation du rôle plus large que joue la **PFK** au sein de la glycolyse (elle est notamment responsable du caractère oscillant et périodique de cette dernière).

Une fois le glucose dégradé en pyruvate, celui-ci, en présence d'oxygène, va alimenter la **respiration mitochondriale** au terme de laquelle 36 ATP vont être générés : c'est donc une voie énergétique très efficace. En absence d'oxygène, il va alimenter la **fermentation**, via l'enzyme lactate déshydrogénase **LDH-A**, au terme de laquelle sera produit de l'acide lactique et 2 ATP : c'est donc une voie énergétique à priori peu ou moins efficace.

En revanche, une particularité des cellules cancéreuses est d'exhiber un fonctionnement métabolique énergétique très différent. En effet il est abondamment observé qu'une cellule cancéreuse persiste à fermenter le pyruvate même en présence d'oxygène [11], ce qu'on nomme l'**effet Warburg**⁴.

2. La phosphorylation est le transfert d'un groupe phosphate (un phosphoryl PO_3^{2-} plus précisément) à une molécule.

3. Une kinase est une enzyme qui transfère des groupements phosphoryle (PO_3^{2-}) entre l'ATP et un métabolite. L'hexokinase catalyse la phosphorylation d'hexoses, comme le glucose ou le fructose.

4. Otto Heinrich Warburg (1883-1970) est un médecin, physiologiste et biochimiste allemand. Il est lauréat du prix Nobel de physiologie ou médecine de 1931 pour "sa découverte de la nature et du mode opératoire de l'enzyme respiratoire". (Wikipedia).

1.1.2 Effet Warburg

Les points clés de la théorie d’Otto Warburg, d’après [22], sont les suivants :

1. la respiration mitochondriale est insuffisante pour couvrir les besoins en ATP de la cellule ; cette insuffisance initie la tumorigénèse⁵ et, à terme, le cancer ;
2. le manque d’énergie produit par la respiration est graduellement compensé par la glycolyse ;
3. les cellules cancéreuses continuent à fermenter le lactate en présence d’oxygène et
4. la déficience en respiration devient éventuellement irréversible.

On définit alors précisément l’effet Warburg comme suit :

Définition 1.2 (Effet Warburg). *L’effet Warburg est une persistance de la fermentation en présence d’oxygène (glycolyse aérobie).*

Otto Warburg supposait qu’une anomalie de la mitochondrie, et donc une insuffisance de la respiration mitochondriale, était la cause de la persistance du métabolisme glycolytique aérobie [17]. Cette hypothèse semble aujourd’hui controversée. Certains auteurs la réfutent. C’est le cas, entre autres, de Thompson et ses collègues qui ne lie pas directement l’effet Warburg à un défaut mitochondrial mais à l’activation d’oncogène⁶ et à une mutation au niveau des voies de signalisation⁷ régulant l’utilisation du glucose (p. 775 de [14]). Au contraire, d’autres auteurs l’appuie. C’est le cas de Thomas N. Seyfried et al dans [22] qui tendent à montrer le rôle capital que joue la mitochondrie dans la survenue et la progression du cancer (voir figure 3 tirée de [22]). Ils font remarquer, entre autres, que l’ultrastructure de la mitochondrie était anormale, à différent degré, chez 778 patients atteints de cancer du sein (p. 517 de [22]), et qu’aucune cellules cancéreuses n’a encore été observée avec une composition en cardiolipine⁸ normale (p.518 de [22]).

En dépit du caractère controversé de l’hypothèse de Warburg (anomalie de la mitochondrie), une abondance d’observations expérimentales soutiennent qu’une persistance de la glycolyse en présence d’oxygène a bien lieu dans la majorité des cancers.

5. La tumorigénèse englobe toutes les étapes menant à la formation des tumeurs.

6. Un oncogène est un gène dont l’expression favorise la survenue d’un cancer. (Wikipédia)

7. La signalisation cellulaire est un système complexe de communication qui régit les processus fondamentaux des cellules et coordonne leur activité. Des dysfonctionnements dans le traitement de l’information cellulaire peuvent être responsables de maladies telles que le cancer, les maladies auto-immunes et le diabète. (Wikipédia)

8. La cardiolipine est un lipide qui représente 18% des molécules de la membrane interne de la mitochondrie et qui est responsable de la forte imperméabilité de la membrane interne aux protons. Elle est notamment essentielle au fonctionnement optimal de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial. (Wikipédia)

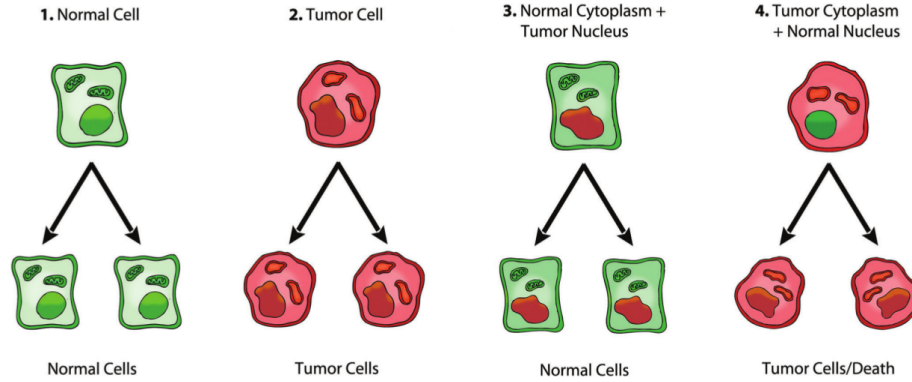
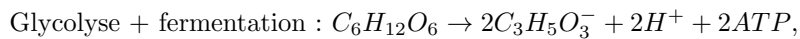


FIGURE 3 – Rôle du noyau et de la mitochondrie dans l'origine du cancer. Ces images résument les observations expérimentales supportant le rôle crucial que joue la mitochondrie dans l'origine et le développement du cancer. (1) Une cellule normale (aucune anomalie au niveau mitochondrial et génétique) engendre des cellules normales. (2) Une cellule cancéreuse (anomalie au niveau mitochondrial et génétique) engendre des cellules cancéreuses. (3) Une cellule présentant un défaut nucléaire et une mitochondrie normale engendre des cellules normales, non cancéreuses. En effet, plusieurs chercheurs montrent que la tumorigénécité (capacité des cellules à dégénérer en tumeur) est supprimée quand une mitochondrie normale est combinée avec un noyau de cellules cancéreuses. De même, plusieurs expériences *in vivo* montrent une suppression de la tumorigénécité lorsqu'un noyau de cellules cancéreuses est introduit dans un cytoplasme contenant une mitochondrie normale (voir p.516 de [22]). (4) Une cellule présentant un noyau sain et un défaut mitochondrial engendre des cellules cancéreuses ou la mort de celles-ci survient, mais pas de cellules normales.

Remarque : On appellera une cellule au phénotype Warburg (ou cellule Warburg), une cellule empruntant majoritairement la voie de la fermentation pour produire ses ATP même en présence d'oxygène (glycolyse aérobie). Plus précisément, une cellule Warburg restera à dominante glycolytique en environnement normoxique mais aura tout de même un petit taux de respiration (voir figure 4), ce qui est conforme à plusieurs observations selon lesquelles la respiration mitochondriale n'est pas complètement hors d'usage pour ces cellules.

Conséquence fondamentale de l'effet Warburg : Donnons dès à présent l'équation bilan de la *glycolyse + fermentation* en omettant toutes les étapes et molécules intermédiaires, et à partir de laquelle on déduira la conséquence fondamentale de l'effet Warburg :



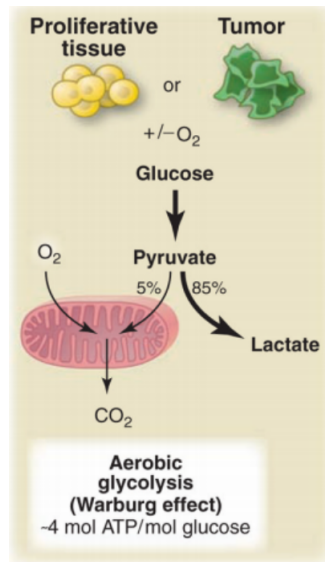


FIGURE 4 – Effet Warburg : persistance de la fermentation en environnement normoxique (glycolyse aérobie)

où $C_6H_{12}O_6$ représente le glucose, $C_3H_5O_3^-$ le lactate, et H^+ les ions hydrogènes.

On observe ainsi qu'**une persistance de la glycolyse aérobie (effet Warburg) va produire une quantité importante de déchets acides** (ions H^+ et lactate) au sein de la cellule, déchets que cette dernière devra expulser, entre autres, dans le milieu extracellulaire pour assurer sa survie. Nous renvoyons à la section 1.4.1 pour la description des mécanismes par lesquels la cellule assure un pH intracellulaire normal et une conséquence essentielle de cela.

Enfin, à l'opposé de l'effet Warburg, on observe l'effet Pasteur :

Définition 1.3 (Effet Pasteur). *L'effet Pasteur est une inhibition des processus de fermentation par le dioxygène.*

Ainsi l'effet Pasteur, pouvant être relié à une cellule saine, entraîne une réduction de la fermentation en présence d'oxygène et une augmentation de la respiration mitochondriale en présence de celui-ci.

1.2 Facteur induit par l'hypoxie HIF

Une des caractéristiques communes à tous les cancers est le manque d'oxygène (hypoxie) au sein de la tumeur ([14], [11], p.1 de [10] + références à l'intérieur de ceux-ci). En réponse à ce manque vont s'exprimer les facteurs induits par l'hypoxie **HIF**. Ce sont des protéines agissant comme des facteurs de transcription⁹ accroissant l'expression d'un ensemble de gènes spécifiques de la cellule

9. Un facteur de transcription est une protéine nécessaire à l'initiation ou à la régulation de la transcription d'un gène.

en présence de faibles concentrations en oxygène pour répondre à cette hypoxie. Ces gènes en question sont impliqués dans une multitude de fonctions cellulaires, comme par exemple le métabolisme glycolytique via l'augmentation de l'expression de ses enzymes (*glut1*, *hk2*, *pgk1*, *ldh-a*), la régulation du pHi et du pHe en augmentant l'expression des anhydrases carboniques 9 et 12 (*ca9*, *ca12*) et du transporteur monocarboxylate MCT4¹⁰, la sensibilité à l'oxygène (*phd2*, *phd3*), la réduction de la respiration (*pdk1*), l'érythropoïèse (*epo*), l'angiogénèse (*vegf*, *ang2*, *il8*), l'autophagie (*bnip3*, *bnip3l*), la migration (*mmp2*), et d'autres encore (voir figure 5) ([12] et [14]). Il est supposé que HIF contrôle jusqu'à 5% du génome humain (p.777 de [14]).

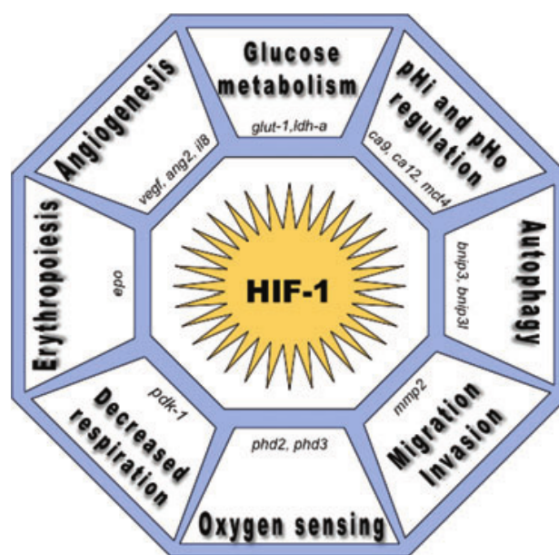


FIGURE 5 – Rôle de HIF-1 dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie dans une tumeur en augmentant l'expression de gènes clés.

1.3 Compétition pour le glucose

On observe qu'au sein du micro-environnement de la tumeur la disponibilité en glucose est limitée et que s'engage alors une compétition entre les cellules cancéreuses et les cellules saines pour l'accès à celui-ci [6]. Voyons le rôle que joue HIF-1 dans cette compétition.

10. Voir section 1.3 pour plus de détails sur les mécanismes de régulation du pHi dans laquelle sont présentés et décrits les anhydrases carboniques et les transporteurs monocarboxylates.

Rôle de HIF-1 sur l'expression de la glycolyse et de ses enzymes : HIF-1 augmente l'expression des transporteurs du glucose ([GLUT-1](#) et [GLUT-3](#)) [14] permettant à la cellule d'en importer et consommer d'avantage [4]. Ainsi la concentration intracellulaire en glucose est plus grande dans une cellule cancéreuse. Notons, en même temps, que HIF-1 déclenche aussi l'expression d'enzymes glycolytiques telles que l'hexokinase ([HK2](#)) catalysant la première réaction, la phosphoglycerate kinase ([PGK1](#)) catalysant la septième réaction, le lactate deshydrogénase ([LDH-A](#)) catalysant le pyruvate en lactate, et promeut donc, en combinaison d'oncogène, la glycolyse aérobie.

Caractéristique avantageuse dans la compétition pour le glucose :

Une cellule utilisant une voie métabolique avec un haut *rendement* et faible *taux*¹¹ produit plus d'ATP pour une quantité donnée de ressource (c'est le cas de la respiration mitochondriale). Cependant, cet avantage disparaît quand la cellule est en compétition pour les ressources avec une cellule dont le *taux* est plus élevé et le *rendement* en ATP est plus faible. En effet il a été montré que les cellules avec un haut taux, mais un rendement faible, de production d'ATP avaient un avantage sélectif dans cette compétition pour le glucose. Cette caractéristique sélectionne ainsi les cellules Warburg, au détriment des cellules Pasteur, dont le rendement de la glycolyse aérobie est de deux ATP (rendement faible) alors que **la production d'ATP par la fermentation est 10 à 100 fois plus rapide que la respiration** (taux rapide) [9].

1.4 Systèmes de régulations du pH intracellulaire

1.4.1 Caractérisation des mécanismes de régulation du pH

Une des caractéristiques des cellules cancéreuses est un pH extracellulaire bas (entre 5.6 et 6.8) et un pH intracellulaire neutre ou alcalin (entre 7.2 et 7.5) ([14] qui cite [15]). Comme expliqué dans la section précédente, les cellules cancéreuses, de par leur phénotype métabolique (glycolyse aérobie), produisent beaucoup de déchets acides (ions H^+ et lactate $C_3H_5O_3^-$). En même temps, il est essentiel pour la cellule de réguler son pH intracellulaire à une valeur normale, puisqu'une variation de 0.1 peut entraîner l'arrêt de multiples fonctions cellulaires telles que la production d'ATP, la synthèse de protéines, la prolifération cellulaire ainsi que la migration et l'apoptose à travers l'activation de la caspase (voir ci-dessous pour plus de détails sur ce dernier mécanisme) [14]. Pour ce faire, la cellule possède plusieurs systèmes de régulation du pH intracellulaire :

1. La famille des **échangeurs sodium-hydrogène** [NHEs](#) (Sodium-Hydrogen Exchanger en anglais) et l'enzyme [V-ATPase](#) :

11. On précise que le *taux* est le nombre d'ATP produit par unité de temps et le *rendement* est le nombre d'ATP produit par molécule de glucose

- La famille **NHEs** présente 9 isoformes¹² dont seulement trois (NHE-1, NHE-2 et NHE-3) ont été identifiés jouant un rôle dans la régulation du pHi. NHE-2 et NHE-3 ont été localisés seulement au niveau de l'intestin et du rein tandis que NHE-1 est abondamment exprimé dans l'ensemble du corps, et c'est sur celui-ci que nous nous concentrons. Celui-ci se localise au niveau de la membrane plasmique de la cellule et son rôle est d'expulser un ion H^+ en échange de l'entrée d'un ion sodium Na^+ , augmentant ainsi le pHi. Le potentiel de NHE-1 à maintenir un pHi normal est très grand. Dans [14] ils mentionnent, entre autres, l'expérience suivante : on injecte une très grande quantité d'ions H^+ (H^+ -suicide technique en anglais) à un hamster exprimant NHE-1, NHE-2 et NHE-3 et on observe une récupération rapide d'un pHi normal, adapté à la survie de celui-ci. Au contraire, les cellules mutées dans lesquelles un manque de NHE-1 est observé ne recouvraient pas leur pHi après l'injection de H^+ et mourraient en moins d'une heure à cause d'une acidification persistante.
- La **V-ATPase** est une enzyme catalysant la réaction :



Elles nécessitent donc de l'ATP et permet l'expulsion d'un ion H^+ en dehors de la cellule.

- La famille de **transporteurs monocarboxylates MCTs** (MonoCarboxylate Transporter) dont le rôle est, entre autres, de transporter le **lactate** hors de la cellule. Elle présente 14 isoformes mais seulement MCT1, MCT2, MCT3 et MCT4 jouent un rôle dans la régulation du pHi. Nous nous concentrerons ici à présenter MCT1 et MCT4 car ils semblent que leur importance est plus grande :
 - **MCT1** permet l'export du lactate hors de la cellule, mais aussi l'import à l'intérieur de celle-ci. Il a été démontré dans [10] que **MCT1 est principalement exprimée dans les cellules aux phénotypes Pasteur.**
 - **MCT4** permet aussi l'export du lactate hors de la cellule mais est peu adapté à l'import de celui-ci. On observe aussi, toujours d'après [10], que **MCT4 est principalement exprimé dans les cellules aux phénotypes glycolytiques.**

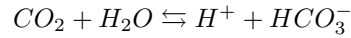
Enfin, notons que les transporteurs MCT1 et MCT4 jouent un rôle fondamental dans un mécanisme important, mis en évidence par Pierre Sonveaux et al [10], que nous décrivons en section 1.5.

- Les **cotransporteurs sodium-bicarbonate NBCs** ($Na^+ - HCO_3^-$ cotransporters) et **échangeurs chlorure/bicarbonate AEs** (Cl^- / HCO_3^- exchangers) favorisent, au contraire des mécanismes décrit précédemment, l'import de bicarbonates HCO_3^- qui sont les principales espèces tampons

12. Les isoformes d'une protéine sont les différentes formes qu'elle prend lorsqu'elle est issue de gènes différents, ou du même gène par épissage alternatif. (Wikipédia)

des ions hydrogènes H^+ , contribuant ainsi à alcaliniser le cytoplasme de la cellule.

4. La famille d'**anhydrases carboniques CAs** permet l'hydratation réversible d'une molécule de CO_2 en $HCO_3^- + H^+$ dont l'équation est la suivante :



Elle présente 16 isoformes dont 3 (voir Figure 6) que nous présentons car elles ont été proposées pour contribuer à la régulation du pHi :

- **CAIX** et **CAXII** sont des CAs membranaires et permettent l'alcalinisation intracellulaire en facilitant l'export extracellulaire du CO_2 . Leurs expressions sont toutes les deux contrôlées par le niveau d'oxygène à travers HIF-1.
- **CAII** est une protéine cytosolique qui permet les échanges gazeux (échange d' O_2 avec CO_2).

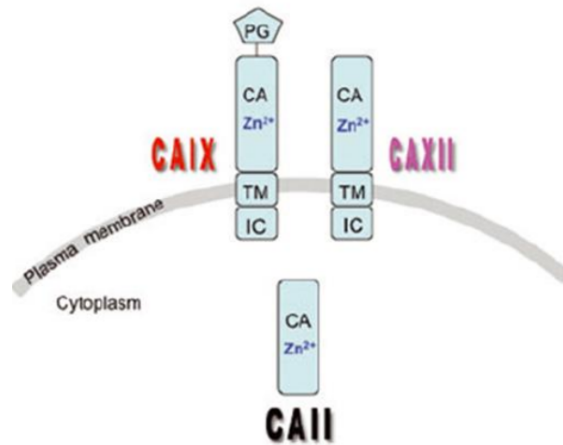


FIGURE 6 – Anhydrases carboniques. PH = protéoglycan, TM = transmembranaire, IC = intracellulaire

L'ensemble des mécanismes de régulation du pHi est résumé par la Figure 7, tirée de [14].

1.4.2 Adaptations des mécanismes de régulations du pHi en réponse au flux glycolytique augmenté

La surexpression de HIF-1 décrit en section 1.2 entraîne une augmentation du flux glycolytique au sein de la tumeur qui a pour conséquence, à priori néfaste, l'augmentation de production de déchets acides au sein de la cellule. Cette

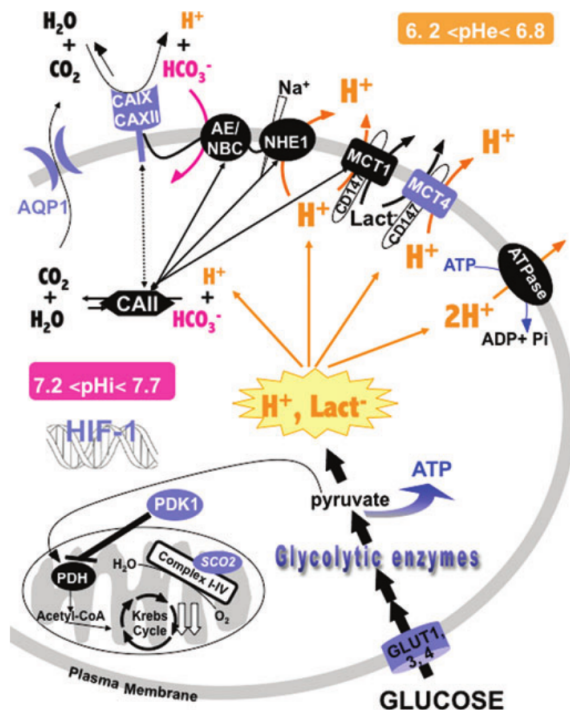


FIGURE 7 – Ensemble des mécanismes de régulations du pH intracellulaire

dernière s'adapte (pour sa survie) à travers, entre autres, la surexpression des mécanismes de régulations du pHi dans le but, toujours, de le maintenir normal. Ont été mis en évidence au sein d'une tumeur les faits suivants :

- HIF-1 augmente l'expression de MCT4 ainsi que l'expression des anhydrases carboniques 9 et 12.
- les échangeurs sodium-hydrogène NHEs et l'enzyme V-ATPase sont surexprimés (p. 895 de [11] + références dans celle-ci).

L'ensemble des mécanismes de régulation du pHi, en le maintenant normal, adapté à la réalisation de multiples fonctions cellulaires fondamentales (voir ci-dessus), entraîne une **acidification du milieu extracellulaire** en expulsant du lactate et des ions H^+ en grande quantité dans celui-ci. Cette acidification du micro-environnement tumoral a une conséquence fondamentale. En effet l'exposition prolongée des cellules normales à un pHe inférieur à environ 7.1 provoque la mort de celles-ci à travers l'expression du facteur de transcription p53 qui régule, entre autres, l'apoptose (lui-même déclenché par une augmentation de l'activité de caspase) ([7], [23]). En revanche, les cellules cancéreuses présentent une mutation de p53 rendant celles-ci beaucoup plus résistantes à un pHe bas (p. 3848 de [21] et p. 895 de [11] + références dans ceux-ci). Ainsi en acidifiant le milieu extracellulaire, les cellules cancéreuses survivent tandis que les cellules saines meurent. Gatenby et Gawlinski ont proposé dans [21] que ce mécanisme

permettait aux cellules cancéreuses d’envahir les tissus environnants (voir la figure 8 tirée de [21]).

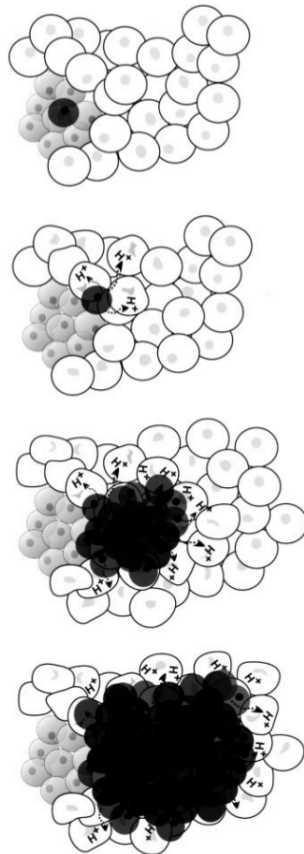


FIGURE 8 – Mécanisme par lequel le phénotype glycolytique (effet Warburg) permet l’invasion des tissus par les cellules cancéreuses. Une cellule au phénotype Warburg apparaît (cellule noire sur la première image). La **diffusion** de ces déchets acides, dont les ions H^+ , dans le milieu extracellulaire va entraîner la diminution du pH provoquant l’apoptose des cellules saines à travers **p53** et la survie des cellules cancéreuses dû à une mutation de celui-ci : les cellules cancéreuses arborent alors un avantage compétitif et peuvent envahir les tissus environnants de cette manière.

1.5 Utilisation du lactate

Comme expliqué précédemment, il existe des zones oxygénées et d’autres non oxygénées au sein d’une tumeur. Il a été démontré dans [10] et [1] que les cellules oxygénées avec un phénotype à dominante Pasteur pouvaient importer, à partir d’un certain seuil de lactate, celui-ci (produit principalement par les cellules avec un phénotype à dominante glycolytique) dans le milieu intracellulaire grâce aux transporteurs MCT1 (voir section 1.4.1) dans le but d’alimenter la respiration mitochondriale, observant ainsi une symbiose entre deux populations de cellules. Celle-ci permettra de préserver le glucose qui servira alors à alimenter les cellules en région hypoxique. L’idée générale, que l’on retrouve dans d’autres phénomènes symbiotique similaire (voir référence dans [10]), est que le déchet (ici le lactate) produit par les cellules à dominante glycolytique peut, en partie, être recyclé par une sous population de cellules (exhibant un phénotype différent) ayant un

meilleur accès à l'oxygène.

On note que le recyclage du lactate est principalement réalisé par les cellules à dominante Pasteur, et non par les cellules à dominante glycolytique (cellules Warburg), car ces dernières ont un niveau d'expression de transporteurs **MCT1** beaucoup plus bas que les cellules Pasteur (voir [10] pour plus de détails à ce sujet). Nous renvoyons à la figure 9 tirée de [10] pour le schéma descriptif de la symbiose opérant entre les deux populations de cellules et la conséquence d'une inhibition de **MCT1**.

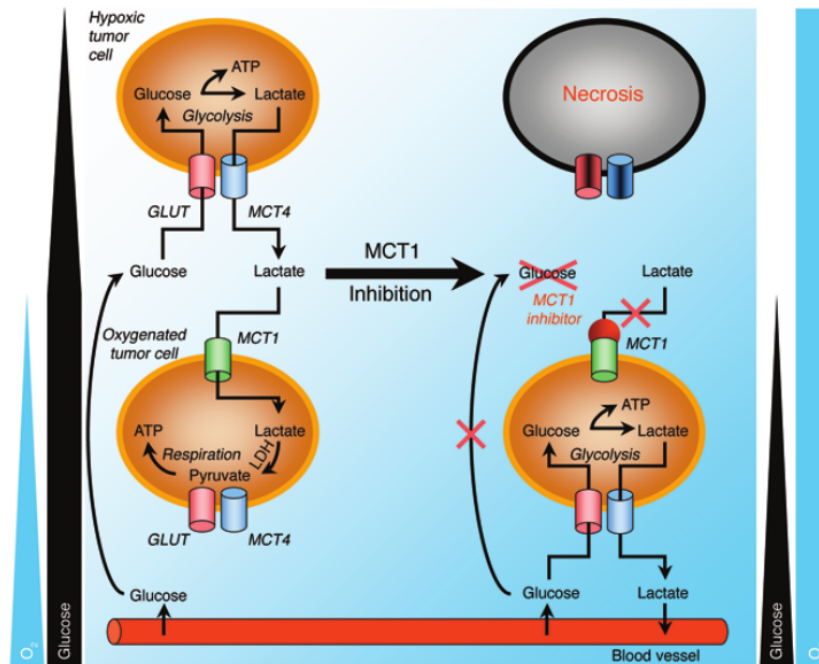


FIGURE 9 – Les cellules hypoxiques de la tumeur dépendent du glucose et de la glycolyse pour produire leur énergie. Le lactate, produit final de la glycolyse, est diffusé à travers la tumeur. Les cellules oxygénées de la tumeur importent alors le lactate, grâce à **MCT1**, qui va être oxydé pour produire de l'énergie. Le lactate est un substrat préféré au glucose pour la respiration mitochondriale. Ainsi, le glucose diffusera librement jusqu'aux cellules tumorales non oxygénées qui alimentera alors la glycolyse. Cette symbiose peut cesser si **MCT1** est inhibé. En effet, en l'inhibant, les cellules tumorales oxygénées vont s'alimenter avec le glucose qui manquera alors pour les cellules non oxygénées qui finiront par mourir.

1.6 Stratégies possibles contre les cellules cancéreuses

Nous avons vu en section 1.4 les mécanismes de régulations du pH intracellulaires. L'une des stratégies possibles visant à éliminer ou réduire les cellules cancéreuses est l'inhibition de ces dits mécanismes, en bloquant par exemple l'export des acides hors de la cellule, qui s'empoisonneraient alors par leurs propres acides en voyant leur pH_i décroître. En effet, comme expliqué plus haut, il est essentiel pour la cellule de conserver un pH_i normal puisque de nombreuses fonctions cellulaires fondamentales à sa survie (**production d'ATP** par exemple) est dépendante de celui-ci. Ainsi, une augmentation de l'acidité intracellulaire entraînera une baisse drastique de la production d'ATP et donc, à terme, l'apoptose. De plus, les auteurs de [14] affirment que "**l'inhibition des mécanismes permettant l'expulsion des acides est une stratégie sélective qui ciblerait seulement les cellules cancéreuses**". Cela s'expliquerait par le fait que les cellules cancéreuses ont un taux de prolifération anormal et ne peuvent pas entrer dans la phase G0 du cycle cellulaire (phase quiescente).

Une autre approche thérapeutique consiste en l'augmentation du pH extracellulaire afin de réduire la formation de métastase et de stimuler l'activité des lymphocytes NK (pour "natural killer") qui sont capables de tuer sélectivement les cellules tumorales ou infectées par des microbes (et dont l'activité se voit réduit en milieu acide).

2 Modèle EDO Lotka-Volterra

En adoptant, en partie, le cadre et la modélisation proposés par Gravenmier et al dans [5], nous considérons **deux populations de cellules** aux phénotypes distincts : une population exhibant un phénotype **Warburg** et une autre population exhibant un phénotype **Pasteur**, préférant ainsi la distinction cellule Warburg vs. Pasteur à celle cancéreuse vs. saine. Le phénotype sera déterminé par la fraction de glucose intracellulaire $\phi \in [0, 1]$ (voir section 2.1.1 pour sa définition) allouée à la fermentation. On notera $n_w(t)$ le nombre de cellules Warburg au temps t et $n_p(t)$ le nombre de cellules Pasteur au temps t . Nous allons nous intéresser à l'évolution de ces populations de cellules structurées en phénotype et en compétition pour l'accès au glucose, en généralisant le modèle Lotka-Volterra discret proposé par Gravenmier et al [5] en un modèle Lotka-Volterra continu d'équations différentielles ordinaires (1) :

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} n_w(t) = r_w^{ATP}(O_2) n_w(t) [1 - A_w(O_2) n_w(t) - \alpha_{wp}(O_2) A_p(O_2) n_p(t)] \\ \frac{d}{dt} n_p(t) = r_p^{ATP}(O_2) n_p(t) [1 - A_p(O_2) n_p(t) - \alpha_{pw}(O_2) A_w(O_2) n_w(t)] \\ O_2 = c \in [0, 7] \quad \text{ou} \quad O_2 \sim \mathcal{N}(\mu, \sigma^2) \end{cases} \quad (1)$$

où :

- r_w^{ATP} et r_p^{ATP} sont les taux de proliférations respectifs des cellules Warburg et Pasteur (voir section 2.1.2),
- A_w et A_p sont les capacités maximales d'accueil respectives des cellules Warburg et Pasteur (voir section 2.1.3),
- α_{pw} et α_{wp} sont les coefficients de compétitions pour l'accès au glucose (voir section 2.1.4)
- $O_2 = 0$ désigne une situation anoxique (absence total d'oxygène) et $O_2 = 7$ désigne une situation normoxique (taux d'oxygène normal)

Hypothèse sur l'oxygène Nous supposons que la concentration en oxygène dans la tumeur est uniforme en espace, i-e que toutes les cellules (Warburg et Pasteur) sont oxygénées de la même manière.

Dans un premier temps, en section 2.1, nous présenterons le cadre de notre modélisation ainsi que les termes intervenant dans notre système d'équations (1) ; nous proposerons aussi des expressions des taux de prolifération qui n'étaient pas explicites dans [5] en nous basant sur des arguments métaboliques similaires à ceux utilisés par Granvemier et Gatenby. En section 2.2 nous étudierons, théoriquement et numériquement, le modèle (1) en considérant le taux d'oxygène constant et nous retrouverons un premier résultat de [5] selon lequel en condition extrême d'oxygène les cellules Warburg dominent alors que les cellules Pasteur sont sélectionnées pour des conditions intermédiaires en oxygène (voir théorème

2.1). En section 2.3 nous considérerons des fluctuations au niveau de l’oxygène et nous retrouverons encore un résultat fondamental de [5] selon lequel les cellules Warburg sont sélectionnées lorsque l’amplitude des variations en oxygène est assez grande. Enfin, en section 2.4, nous étendrons le modèle (1) en prenant en compte le mécanisme de recyclage du lactate, décrit en section 1.5, de telle manière que la compétition pour l’accès au glucose diminue et qu’une coexistence des deux populations de cellules puisse avoir lieu.

2.1 Cadre et hypothèses de la modélisation

Détaillons tout d’abord le mécanisme fondamental décrit par la figure 10 tirée de [5]. Soit une concentration de glucose intracellulaire $G = [C_6H_{12}O_6]$ proportionnelle à la *capacité de transport* C . On détaillait en section 1.3 la capacité des cellules Warburg à importer d’avantage de glucose (surexpression des transporteurs GLUTs grâce à HIF-1), se traduisant dans notre modèle en posant $C_w = 10$ et $C_p = 1$. Autrement dit, la concentration intracellulaire en glucose des cellules Warburg va être 10 fois plus grande que celle des cellules Pasteur. Parmi celle-ci une fraction $0 \leq \phi \leq 1$ va alimenter la fermentation, tandis qu’une fraction $1 - \phi$ va alimenter la respiration. De plus, comme décrit en section 1.3, la vitesse de fermentation est 10 à 100 fois plus rapide que la respiration ; nous traduisons cela en posant, par exemple, $k_1 = 100$ et $k_2 = 1$. Enfin, sachant que le rendement de la fermentation est de 2 ATPs tandis que la respiration 36 ATPs, on pose $x = 2$ et $y = 36$.

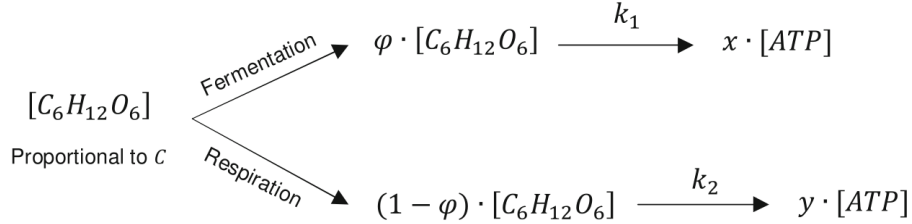


FIGURE 10 – Allocation d’une fraction ϕ du glucose pour la fermentation et $1 - \phi$ pour la respiration

2.1.1 Expression de la fonction ϕ déterminant le phénotype

La fonction ϕ , dépendante du taux d’oxygène O_2 , prend la forme

$$\phi(O_2) = \exp(-\mu \cdot O_2) \quad (2)$$

où μ est une constante déterminant la forme de la relation entre ϕ et O_2 .

Pour les cellules Warburg nous posons $\mu = 0.005$ tel que

$$\phi_w(O_2) = \exp(-0.005 \cdot O_2),$$

et de telle sorte que, quelque soit le taux d'oxygène (même très grand), ϕ va rester très proche de 1 (voir figure 11) traduisant ainsi le fait qu'indépendamment de l'oxygène la cellule Warburg va fermenter la plus grande partie du glucose. Notons bien que l'origine de la figure 11 n'est pas 0 mais 0.965, une valeur très proche de 1, comme attendue.

Pour les cellules Pasteur on pose $\mu = 0.347$ tel que

$$\phi_p(O_2) = \exp(-0.347 \cdot O_2),$$

où ϕ va décroître beaucoup plus rapidement vers 0 en présence d'oxygène, traduisant le fait qu'en présence de celui-ci la cellule va bien majoritairement allouer son glucose pour la respiration (voir figure 12)

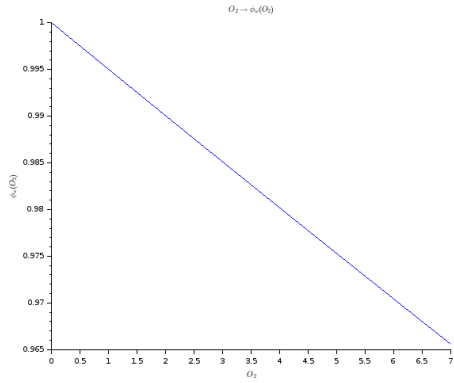


FIGURE 11 – $O_2 \rightarrow \phi_w(O_2)$

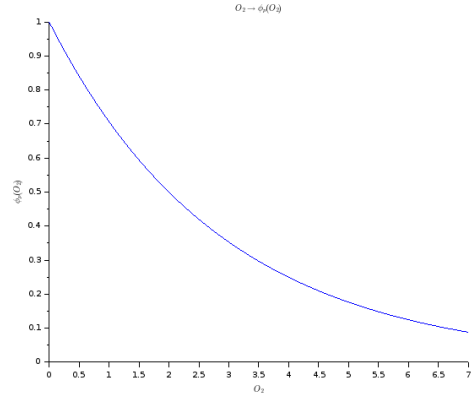


FIGURE 12 – $O_2 \rightarrow \phi_p(O_2)$

Nous précisons que ces expressions permettent, d'après Gravenmier et al [5], de retrouver les valeurs expérimentales de [8].

2.1.2 Expression des taux de prolifération

On suppose que le taux de prolifération des cellules est proportionnel à leur taux de production d'ATP ([9], [2], [16]), i-e proportionnel au nombre d'ATP produits par unité de temps. Nous nous basons, pour les cellules Warburg, sur les données de Bauchop et al [2] dont les expériences ont été réalisées en milieu anaérobie où les organismes génèrent leurs ATPs par la fermentation (similaire donc aux cellules Warburg), et selon lesquelles une moyenne de 10.5 grammes (poids sec¹³) de cellules par ATP était générées (voir table 3 de [2]).

13. *Dry weight* en anglais. Il réfère au poids d'un tissu animal après qu'il ait été séché à 65°C jusqu'à ce qu'il ait atteint un poids constant. Le *poids sec* représente donc la matière organique et inorganique total dans un tissu.

Par souci de simplification nous confondrons les *grammes* avec le *nombre* ; autrement dit nous considérerons que 10.5 cellules Warburg sont générées par ATP produits. Nous poserons donc

$$Y_w^{ATP} = 10.5.$$

De plus, le nombre d'ATP produit par **une** cellule Warburg au temps t , noté $n_{ATP,w}(t)$, est le suivant :

$$n_{ATP,w}(t) = C_w[2k_1\phi_w(O_2(t)) + 36k_2(1 - \phi_w(O_2(t)))]$$

On déduit alors le taux de prolifération des cellules Warburg r_w^{ATP} dont l'exposant indique que celui-ci dépend du nombre d'ATP :

$$r_w^{ATP}(t) = Y_w^{ATP} \cdot n_{ATP,w}(t)$$

Le taux de prolifération des cellules Pasteur se déduit en procédant de la même manière, de telle sorte qu'on ait

$$r_p^{ATP}(t) = Y_p^{ATP} \cdot n_{ATP,p}(t)$$

où $n_{ATP,p}(t) = C_p[2k_1\phi_p(O_2(t)) + 36k_2(1 - \phi_p(O_2(t)))]$. En revanche il semble plus compliqué, d'après [16], de déterminer expérimentalement Y_p^{ATP} . Nous le fixerons alors arbitrairement à 10.5, comme pour les cellules Warburg.

2.1.3 Expression des capacités maximales d'accueil

Soit K la capacité maximale d'accueil des deux populations, i-e K le nombre de cellules totales (Warburg et Pasteur) que le milieu peut accueillir/supporter. Les capacités maximales d'accueils des populations Warburg et Pasteur, qu'on note respectivement A_w et A_p , sont, comme pour les coefficients de compétitions, définies en utilisant un argument métabolique :

$$\begin{cases} A_w(O_2) = \frac{1}{K} \cdot \frac{x\phi_p(O_2) + y(1 - \phi_p(O_2))}{x\phi_w(O_2) + y(1 - \phi_w(O_2))} & (3) \\ A_p(O_2) = \frac{1}{K} \cdot \frac{x\phi_w(O_2) + y(1 - \phi_w(O_2))}{x\phi_p(O_2) + y(1 - \phi_p(O_2))} & (4) \end{cases}$$

2.1.4 Coefficients de compétition pour le glucose

Comme décrit en section 1.3, les cellules sont en compétition pour l'accès au glucose. Les coefficients de compétitions sont notés α . Par exemple, α_{pw} décrit l'effet que les cellules Warburg ont sur la croissance des cellules Pasteur. Ils sont

déterminés par les taux de consommation de glucose, influencés par les capacités de transport C , ϕ , k_1 et k_2 . On les définit, d'après [5], comme suit :

$$\left\{ \begin{array}{l} \alpha_{wp}(O_2(t)) = \frac{C_p [k_1 \phi_p(O_2(t)) + k_2 (1 - \phi_p(O_2(t)))]}{C_w [k_1 \phi_w(O_2(t)) + k_2 (1 - \phi_w(O_2(t)))]} \\ \alpha_{pw}(O_2(t)) = \frac{C_w [k_1 \phi_w(O_2(t)) + k_2 (1 - \phi_w(O_2(t)))]}{C_p [k_1 \phi_p(O_2(t)) + k_2 (1 - \phi_p(O_2(t)))]} \end{array} \right. \quad (5)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \alpha_{wp}(O_2(t)) = \frac{C_p [k_1 \phi_p(O_2(t)) + k_2 (1 - \phi_p(O_2(t)))]}{C_w [k_1 \phi_w(O_2(t)) + k_2 (1 - \phi_w(O_2(t)))]} \\ \alpha_{pw}(O_2(t)) = \frac{C_w [k_1 \phi_w(O_2(t)) + k_2 (1 - \phi_w(O_2(t)))]}{C_p [k_1 \phi_p(O_2(t)) + k_2 (1 - \phi_p(O_2(t)))]} \end{array} \right. \quad (6)$$

Nous donnons l'allure des coefficients de compétitions en fonction de l'oxygène en figure 13 et 14.

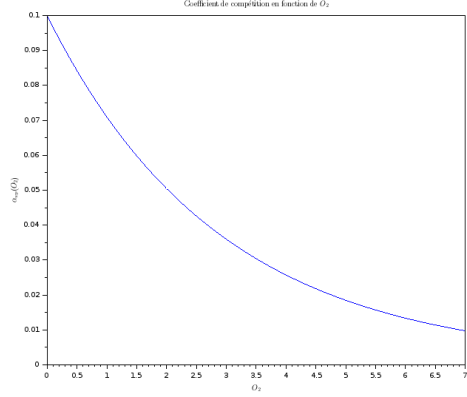


FIGURE 13 – $O_2 \rightarrow \alpha_{wp}(O_2)$

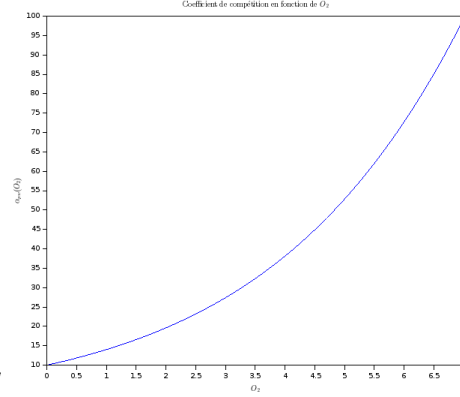


FIGURE 14 – $O_2 \rightarrow \alpha_{pw}(O_2)$

On observe alors que pour tout $O_2 \in [0, 7]$, $\alpha_{wp}(O_2) < 1 < \alpha_{pw}(O_2)$, modélisant le fait que les cellules Warburg dominent la compétition pour l'accès au glucose. Ceci est bien cohérent avec ce que nous détaillons en section 1.3 où nous expliquons que les cellules avec un haut taux, mais un rendement faible, de production d'ATP avaient un avantage sélectif dans cette compétition pour le glucose [9].

2.2 Étude du modèle Lotka-Volterra avec taux d'oxygène constant

Nous étudierons dans cette section le modèle (1) avec un taux d'oxygène constant, à savoir :

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}n_w(t) = r_w^{ATP}(O_2)n_w(t)[1 - A_w(O_2)n_w(t) - \alpha_{wp}(O_2)A_w(O_2)n_p(t)], \\ \frac{d}{dt}n_p(t) = r_p^{ATP}(O_2)n_p(t)[1 - A_p(O_2)n_p(t) - \alpha_{pw}(O_2)A_p(O_2)n_w(t)], \\ O_2 = c \in [0, 7]. \end{cases} \quad (7)$$

2.2.1 Étude théorique

Nous renvoyons au théorème 2.1 de fin de section pour la conclusion globale de l'étude théorique du système (7) que nous menons ici. Commençons par adimensionnaliser (7) en posant

$$w(\tau) = A_w n_w(\tau), \quad p(\tau) = A_p n_p(\tau), \quad \tau = r_w(t),$$

$$a_{wp} = \alpha_{wp} \frac{A_w}{A_p}, \quad a_{pw} = \alpha_{pw} \frac{A_p}{A_w}, \quad \rho = \frac{r_p}{r_w}$$

de telle sorte qu'on obtienne le système suivant :

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}w(\tau) = w(\tau)(1 - w(\tau) - a_{wp}p(\tau)) := g_1(w, p) \\ \frac{d}{dt}p(\tau) = \rho p(\tau)(1 - p(\tau) - a_{pw}w(\tau)) := g_2(w, p) \end{cases} \quad (8)$$

On détermine facilement, par un calcul direct, les quatre points d'équilibre du système (8) :

$$\begin{cases} (w^*, p^*) = (0, 0); & (9) \\ (w^*, p^*) = (0, 1); & (10) \\ (w^*, p^*) = (1, 0); & (11) \\ (w^*, p^*) = \left(\frac{1 - a_{wp}}{1 - a_{wp}a_{pw}}, \frac{1 - a_{pw}}{1 - a_{pw}a_{wp}} \right) & (12) \end{cases}$$

On note que le point d'équilibre (12) a un sens si $a_{wp}a_{pw} \neq 1$, $w^* \geq 0$ et $p^* \geq 0$ et cette positivité est assurée si $a_{wp} > 1, a_{pw} > 1$ ou $a_{wp} < 1, a_{pw} < 1$.

Étudions à présent la stabilité de ces quatre points en étudiant les signes des parties réelles des valeurs propres associés à chacun d'eux. On pose

$$\begin{aligned} dg(w^*, p^*) &= \begin{pmatrix} \frac{\partial g_1(w^*, p^*)}{\partial w} & \frac{\partial g_1(w^*, p^*)}{\partial p} \\ \frac{\partial g_2(w^*, p^*)}{\partial w} & \frac{\partial g_2(w^*, p^*)}{\partial p} \end{pmatrix} \\ &= \begin{pmatrix} 1 - 2w^* - a_{wp}p^* & -a_{wp}w^* \\ -\rho a_{pw}p^* & \rho(1 - 2p^* - a_{pw}w^*) \end{pmatrix} \end{aligned}$$

Étude de la stabilité du point d'équilibre (9) : Les valeurs propres de la matrice

$$dg(0, 0) = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & \rho \end{pmatrix}$$

sont $\lambda_1 = 1$ et $\lambda_2 = \rho$ dont les parties réelles sont positives, ce qui permet de conclure que $(0, 0)$ **est un point d'équilibre instable**

Étude de la stabilité du point d'équilibre (10) : Les valeurs propres de la matrice

$$dg(0, 1) = \begin{pmatrix} 1 - a_{wp} & 0 \\ -\rho a_{pw} & -2\rho \end{pmatrix}$$

sont $\lambda_1 = -\rho$ et $\lambda_2 = 1 - a_{wp}$ où la partie réelle de λ_1 est toujours négative et celle de λ_2 est négative si $a_{wp} > 1$. Donc $(0, 1)$ **est un point d'équilibre stable si $a_{wp} > 1$** .

Étude de la stabilité du point d'équilibre (11) : Les valeurs propres de la matrice

$$dg(1, 0) = \begin{pmatrix} -1 & -a_{wp} \\ 0 & \rho(1 - a_{pw}) \end{pmatrix}$$

sont $\lambda_1 = -1$ et $\lambda_2 = \rho(1 - a_{pw})$ où la partie réelle de λ_1 est toujours négative et celle de λ_2 est négative si $a_{pw} > 1$. Donc $(1, 0)$ **est un point d'équilibre stable si $a_{pw} > 1$** .

Étude de la stabilité du point d'équilibre (12) : Les valeurs propres de la matrice aux points $(w^*, p^*) = \left(\frac{1 - a_{wp}}{1 - a_{wp}a_{pw}}, \frac{1 - a_{pw}}{1 - a_{pw}a_{wp}} \right)$ sont

$$\begin{aligned} \lambda_1, \lambda_2 &= [2(1 - a_{wp}a_{pw})]^{-1} [(a_{wp} - 1) + \rho(a_{pw} - 1) \\ &\quad \pm \{[(a_{wp} - 1) + \rho(a_{pw} - 1)]^2 - 4\rho(1 - a_{wp}a_{pw})(a_{wp} - 1)(a_{pw} - 1)\}^{1/2}] \end{aligned}$$

Le point d'équilibre existant seulement si $a_{wp} > 1, a_{pw} > 1$ ou $a_{wp} < 1, a_{pw} < 1$, nous étudions sa stabilité en fonction de ces conditions.

1. Cas $a_{wp} > 1, a_{pw} > 1$:
Comme $1 - a_{wp}a_{pw} < 0$, $a_{wp} - 1 > 0$ et $a_{pw} - 1 > 0$, on voit immédiatement que $\lambda_1 > 0 > \lambda_2$ et de conclure que (w^*, p^*) **est un point d'équilibre instable** (point selle) **dans ce cas là.**
2. Cas $a_{wp} < 1, a_{pw} < 1$:
Comme $1 - a_{wp}a_{pw} > 0$, $a_{wp} - 1 < 0$ et $a_{pw} - 1 < 0$, on voit immédiatement que $\lambda_1, \lambda_2 < 0$ et de conclure que (w^*, p^*) **est un point d'équilibre stable dans ce cas là .**

Conclusion globale : Nous concluons en résumant les 4 dynamiques possibles du système (8) en fonction du signe de a_{wp} et a_{pw} :

- a) Cas $a_{wp} < 1, a_{pw} < 1$:
D'après ce qu'on a fait précédemment on voit que $(0, 0)$, $(0, 1)$, $(1, 0)$ sont instables et que le point d'équilibre (12) est stable.
- b) Cas $a_{wp} > 1, a_{pw} > 1$:
Dans ce cas là on voit que $(0, 0)$ et (12) sont instables et que $(0, 1)$ et $(1, 0)$ sont stables.
- c) Cas $a_{wp} < 1, a_{pw} > 1$:
Ici le point d'équilibre (12) n'existe pas et on en déduit que $(0, 0)$ et $(0, 1)$ sont instables et que $(1, 0)$ est stable. En d'autres termes $w \rightarrow 1$ et $p \rightarrow 0$, c'est-à-dire **la population de cellules Pasteur n_p est ici éliminée tandis que la population de cellules Warburg n_w tend vers sa capacité maximale d'accueil.**
- d) Cas $a_{wp} > 1, a_{pw} < 1$:
De même, (12) n'existe toujours pas, $(0, 0)$ et $(1, 0)$ sont instables et $(0, 1)$ est stable. C'est-à-dire que **la population Pasteur n_p tend vers sa capacité maximale d'accueil tandis que la population Warburg n_w tend à disparaître.**

Remarque : Les cas b), c) et d) modélisent un principe d'exclusion, c'est-à-dire qu'une seule population de cellules survit tandis que l'autre s'éteint, alors que le cas a) modélise un principe de coexistence dans lequel aucune des populations ne s'éteint.

Allure de a_{wp} et a_{pw} : Nous étudions à présent numériquement les coefficients a_{wp} et a_{pw} en les traçant dans le plan.

D'après les figures 15 et 16 et l'utilisation de la fonction *fsolve* de Scilab on déduit que :

- $\forall O_2 \leq 0.47$ et $O_2 > 7.25$, $a_{wp}(O_2) < 1$; $\forall 0.47 < O_2 \leq 7.25$, $a_{wp}(O_2) > 1$.
- $\forall O_2 \leq 0.47$ et $O_2 > 7.25$, $a_{pw}(O_2) > 1$; $\forall 0.47 < O_2 \leq 7.25$, $a_{pw}(O_2) < 1$

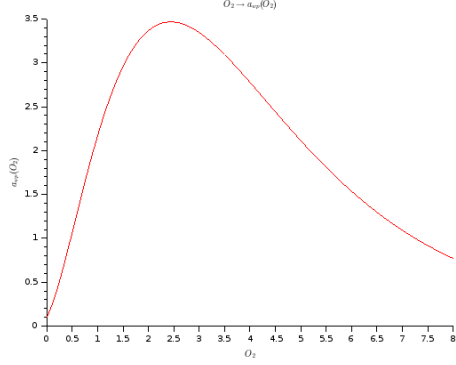


FIGURE 15 – $O_2 \rightarrow a_{wp}(O_2)$

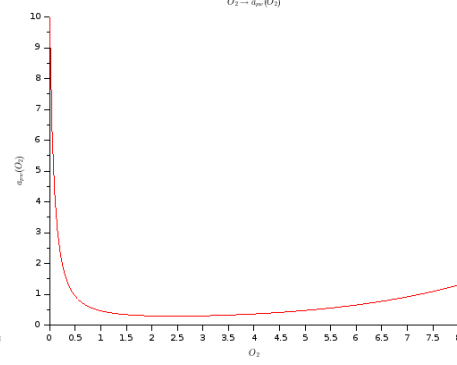


FIGURE 16 – $O_2 \rightarrow a_{pw}(O_2)$

De cette manière $\forall O_2 \leq 0.47$ et $O_2 > 7.25$ on a $a_{wp}(O_2) < 1$ et $a_{pw}(O_2) > 1$, ce qui est le cas c) ci-dessus. Aussi $\forall 0.47 < O_2 \leq 7.25$ on a $a_{wp}(O_2) > 1$ et $a_{pw}(O_2) < 1$, ce qui est le cas d) ci-dessus.

On en déduit alors le théorème suivant :

Théorème 2.1. *Pour tout $O_2 \leq 0.47$ et $O_2 > 7.25$, ou autrement dit en conditions d'oxygènes extrêmes, le phénotype Warburg est sélectionné (les cellules Warburg dominant). Au contraire, pour tout $0.47 < O_2 \leq 7.25$ les cellules Pasteur dominant et sont sélectionnées.*

2.2.2 Résultats numériques

Nous traçons dans le plan les solutions $n_w(t), n_p(t)$ (t en abscisse et $n_w(t), n_p(t)$ en ordonnée) avec pour condition initiale $(n_w^0, n_p^0) = (1, 100)$, $K = 100000$, et avec différents taux d'oxygènes O_2 constants (voir figure 17-21). Nous utilisons pour cela soit une méthode de Runge-Kutta d'ordre 4, soit directement la fonction *ode* prédéfinie dans Scilab; nous renvoyons à l'annexe B.1 pour l'implémentation du schéma et des différentes fonctions nécessaires.

Observation : On retrouve bien en figure 17-21 la conclusion du théorème 2.1 : les cellules Warburg dominant en conditions "extrêmes", c'est-à-dire quand l'oxygène est à un niveau très bas ou très élevé, tandis que les cellules Pasteur dominant entre ces deux "extrêmes".

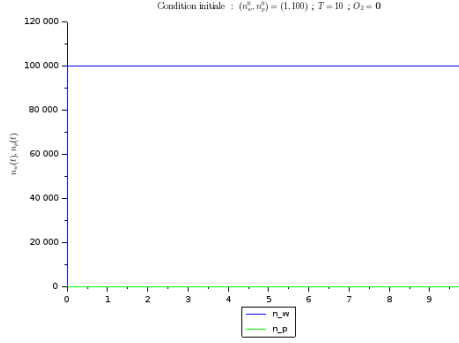


FIGURE 17 – $O_2 = 0$

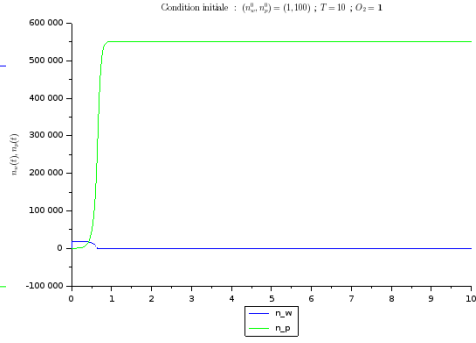


FIGURE 18 – $O_2 = 1$

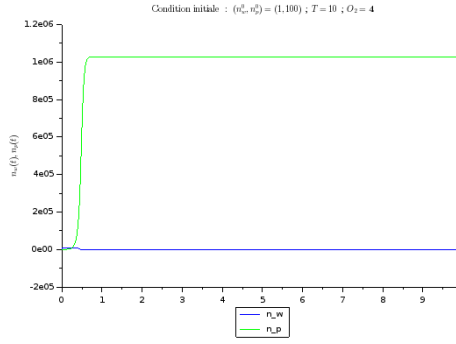


FIGURE 19 – $O_2 = 4$

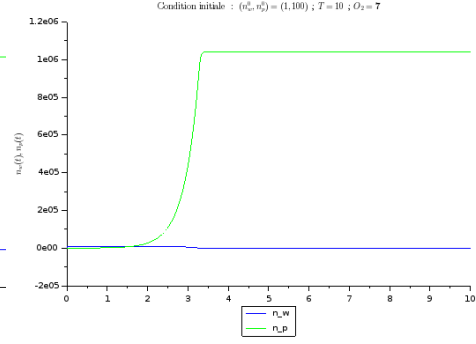


FIGURE 20 – $O_2 = 7$

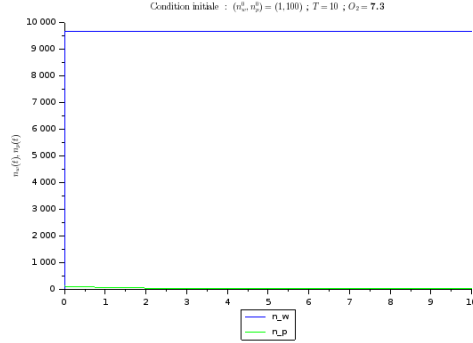


FIGURE 21 – $O_2 = 7.3$

2.3 Compétition avec stochasticité de l'oxygène

Nous introduisons de la stochasticité au niveau de l'oxygène en considérant que $O_2 \sim \mathcal{N}(\mu, \sigma^2)$ où μ sera plus proche de 0 que de 7 pour traduire l'observation expérimentale selon laquelle il y a un manque d'oxygène caractéristique au sein

de la tumeur, et où σ^2 donnera l'*amplitude* des fluctuations. On a alors le système suivant :

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}n_w = r_w^{ATP}(O_2)n_w[1 - A_w(O_2)n_w - \alpha_{wp}(O_2)A_w(O_2)n_p], \\ \frac{d}{dt}n_p = r_p^{ATP}(O_2)n_p[1 - A_p(O_2)n_p - \alpha_{pw}(O_2)A_p(O_2)n_w], \\ O_2 \sim \mathcal{N}(\mu, \sigma^2), \end{cases} \quad (13)$$

où nous fixons ici $\mu = 3$ et où σ^2 sera choisi selon le cas qui veut être étudié.

Résultats numériques : Nous traçons dans le plan les solutions $n_w(t), n_p(t)$ (t en abscisse et $n_w(t), n_p(t)$ en ordonnée) avec pour condition initiale $(n_w^0, n_p^0) = (1, 100)$, $K = 100000$, $T=5$ et différents niveaux d'amplitudes de stochasticité de l'oxygène, codé mathématiquement par l'écart-type σ (voir figure 22-25). Nous simulons une valeur gaussienne à chaque pas de temps et, si celle-ci est négative nous la mettons à 0, tandis que si celle-ci est supérieure à 8 nous la fixons à 8 (voir annexe B.4 pour l'ensemble du code).

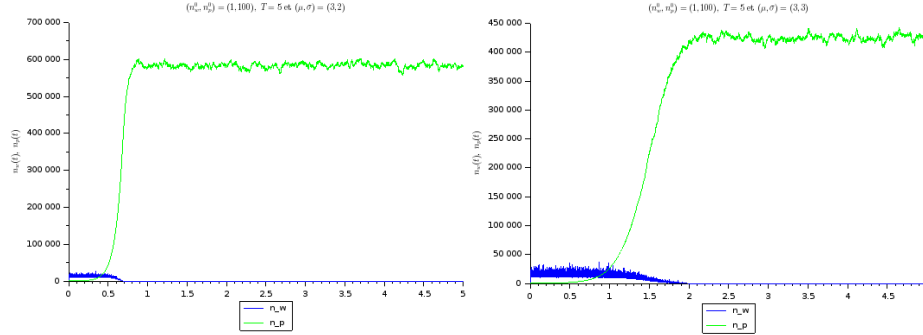


FIGURE 22 – Écart-type $\sigma = 2$

FIGURE 23 – Écart-type $\sigma = 3$

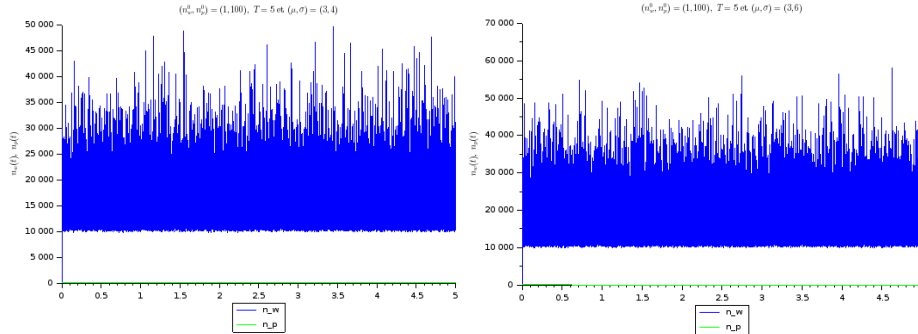


FIGURE 24 – Écart-type $\sigma = 4$

FIGURE 25 – Écart-type $\sigma = 6$

Observation : Nous observons en figure 22-25 que l'issue de la compétition entre les deux populations de cellules dépend de l'amplitude des fluctuations de l'oxygène. Lorsque les fluctuations sont petites les cellules Pasteur dominent tandis que des fluctuations assez grandes vont sélectionner le phénotype Warburg. En outre, plus les fluctuations sont grandes, plus les cellules Warburg dominent (en nombre de cellules).

Ceci s'explique mathématiquement d'après notre étude théorique de la section 2.2.1. En effet, plus les fluctuations d'oxygène sont grandes, plus notre taux d'oxygène sera compris entre 0 et 0.47 et entre 7.25 et 8 et, de cette manière, d'après le théorème 2.1, on aura bien sélection du phénotype Warburg.

2.4 Modèle EDO Lotka-Volterra avec compétition et coopération

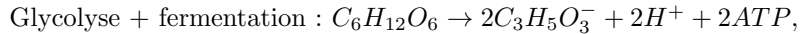
Nous avons détaillé en section 1.5 le mécanisme par lequel les cellules Pasteur oxygénées de la tumeur recycloient et utilisaient le lactate, à partir d'un seuil de lactate L_* , produit par les cellules Warburg pour alimenter la respiration mitochondriale, entraînant ainsi une coopération entre les deux populations aux phénotypes distincts. Il est donc nécessaire de déterminer l'évolution du lactate au cours du temps dans la tumeur. On cherche donc à écrire une EDO sur $L(t)$ qui représente le nombre de lactate présent dans le milieu au temps t et qui prendra donc la forme :

$$L(t) = \text{production}(t) - \text{consommation}(t)$$

où $\text{production}(t)$ est le nombre de lactate produits au temps t (section 2.4.1) et $\text{consommation}(t)$ est le nombre de lactate consommés au temps t (section 2.4.2)

2.4.1 Détermination du nombre de lactate produits au temps t

Rappelons l'équation bilan de la glycolyse + fermentation en omettant les réactions et molécules intermédiaires :



où $C_6H_{12}O_6$ représente le glucose, $C_3H_5O_3^-$ le lactate, et H^+ les ions hydrogènes. Ainsi, chaque molécule de glucose empruntant la voie de la fermentation est équivalent à deux molécules de lactates produites. Déterminons le nombre total de lactate produits au temps t par les cellules Warburg. Ces dernières ont une concentration intracellulaire en glucose C_w et seule la fraction de glucose ϕ_w servant à la fermentation va produire du lactate. Il y a donc $C_w\phi_w(O_2(t))$ glucoses alloués à la fermentation et chacun d'eux produits deux lactates, entraînant un **nombre total de $2C_w\phi_w(O_2(t))$ lactates produits par cellule Warburg au temps t** . Le nombre total de cellules Warburg au

temps t étant $n_w(t)$, on en déduit qu'il y a $2C_w\phi_w(O_2(t))n_w(t)$ **lactates produits au temps t par l'ensemble des cellules Warburg**. On suit le même raisonnement pour les cellules Pasteur et on écrit alors le nombre total de lactate produits au temps t comme suit :

$$production(t) = 2k_1C_w\phi_w(O_2(t))n_w(t) + 2k_2C_p\phi_p(O_2(t))n_p(t) \quad (14)$$

2.4.2 Détermination du nombre de lactate consommé au temps t

Le nombre de lactate consommé au temps t est donné par

$$consommation(t) = s_1(O_2)s_2(L(t))dL(t)n_p(t) + cL(t), \quad (15)$$

où nous expliquons à présent chacun des termes. Le terme $dL(t)n_p(t)$ signifie que le lactate consommé au sein de la tumeur est proportionnel au nombre de cellules Pasteur ; nous faisons donc l'hypothèse que seule les cellules Pasteur consomment le lactate car, comme détaillé en section 1.5, les cellules Warburg ont un niveau d'expression de transporteurs MCT1 (responsable de l'import de lactate dans la cellule) très bas, que nous négligeons donc.

La fonction $s_2(L)$ modélise le recyclage du lactate à partir d'un certain seuil L_* , ce qui se fait par une fonction sigmoïde de la forme

$$s_2(L) = \frac{1}{2}[1 + \tanh(\gamma(L - L_*))]$$

où le paramètre γ peut-être vu comme une mesure de la sensibilité des cellules au lactate proche de L_* . La fonction s est très proche de 0 pour des valeurs inférieures à L_* et grandit plus ou moins brutalement, en fonction de la valeur de γ , en 1 quand L arrive autour de L_* .

De même, le recyclage du lactate ne s'opère que si l'oxygène est suffisant, ce qu'on modélise par la fonction s_1 (figure 26) qui vaut 0 pour un taux d'oxygène inférieur à 4 et grandit plus ou moins vite en 1 quand l'oxygène arrive proche de 4.

$$s_1(O_2) = \frac{1}{2}[1 + \tanh(\gamma(O_2 - 4))]$$

Enfin $cL(t)$ modélise un taux de réabsorption naturel du lactate.

Déduction de l'équation sur le lactate : On en déduit alors naturellement des expressions précédentes l'équation sur $L(t)$:

$$\frac{d}{dt}L(t) = 2k_1C_w\phi_w(O_2(t))n_w(t) + 2k_2C_p\phi_p(O_2(t))n_p(t) - s_1(O_2)s_2(L(t))dL(t)n_p(t) - cL(t)$$

Nous donnons alors le modèle suivant :

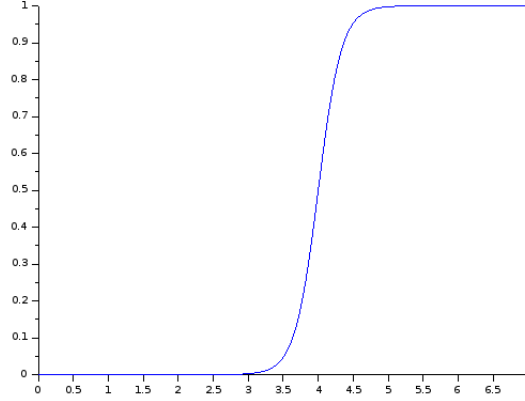


FIGURE 26 – $s_1 : O_2 \rightarrow s_1(O_2)$ pour $\gamma = 3$

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}n_w = r_w^{ATP}(O_2)n_w[1 - A_w(O_2)n_w - \alpha_{wp}(O_2)A_w(O_2)n_p], \\ \frac{d}{dt}n_p = r_p^{ATP}(O_2)n_p[1 - A_p(O_2)n_p - \frac{\alpha_{pw}(O_2)}{\tau L}A_p(O_2)n_w] \\ \frac{d}{dt}L = 2k_1C_w\phi_w(O_2)n_w + 2k_2C_p\phi_p(O_2)n_p - s_1(O_2)s_2(L)dLn_p - cL, \\ O_2 \sim \mathcal{N}(\mu, \sigma^2) \text{ ou } O_2 = \text{cte}, \end{cases} \quad (16)$$

où τ est une constante.

2.4.3 Résultats théoriques

Nous pouvons affirmer dès à présent la proposition suivante :

Proposition 2.1. *Pour tout $O_2 \leq 0.47$ et $O_2 > 7.25$ nous avons une coexistence des deux populations de cellules Warburg et Pasteur. Autrement dit, nous avons coexistence des deux populations seulement en condition extrême d'oxygène.*

En effet, d'après notre étude théorique menée en section 2.2.1, on sait que la coexistence est possible si et seulement si $a_{wp} < 1$ et $a_{pw} < 1$. Or en divisant α_{pw} par L dans notre nouvelle équation, il est clair qu'on aura $a_{pw} < 1$ pour tout $O_2 \in [0, 8]$. De plus, $a_{wp} < 1$ pour tout $O_2 \leq 0.47$ et $O_2 > 7.25$. Ainsi on aura en même temps $a_{wp} < 1$ et $a_{pw} < 1$ pour tout $O_2 \leq 0.47$ et $O_2 > 7.25$.

2.4.4 Résultats numériques

Nous proposons à présent les résultats des simulations numériques en figure 27-28 où on a fixé $T = 30$, $c = d = 100$, $\Delta t = 0.0002$ et où le taux d'oxygène est fixé.

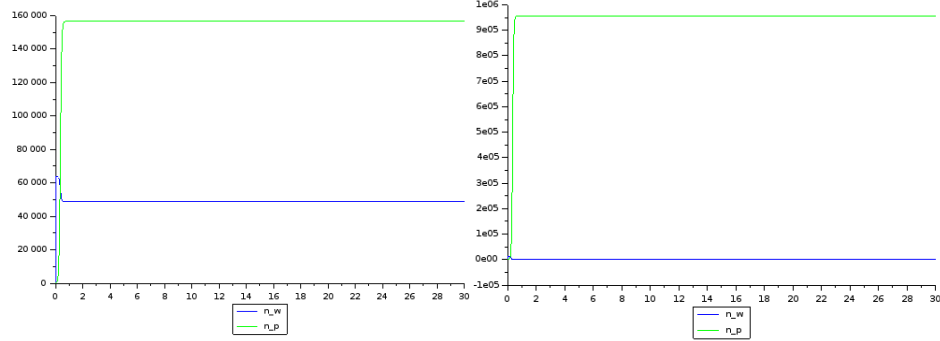


FIGURE 27 – Solutions n_w , n_p pour $O_2 = 0.1$ FIGURE 28 – Solutions n_w , n_p pour $O_2 = 3$

Observation : On retrouve bien les résultats de la proposition 2.1 selon lesquels on a coexistence pour un taux d'oxygène inférieur à 0.47 mais pas pour O_2 compris entre 0.47 et 7.25.

2.5 Limites de notre modèle

Une des limites de notre modèle vient de notre hypothèse qui consiste à considérer que la concentration en oxygène dans la tumeur est uniforme en espace, *i-e* que toutes les cellules (Warburg et Pasteur) sont oxygénées de la même manière. Ainsi, il sera nécessaire dans des études ultérieures d'ajouter une variable d'espace pour prendre en compte l'hétérogénéité spatiale de la concentration en oxygène dans la tumeur. C'est en effet ce qu'on observe expérimentalement : des zones fortement oxygénées tandis que d'autres le sont très peu.

De plus, comme le note Gravenmier et Gatenby dans [5], ne considérer seulement que deux phénotypes de cellules composant une tumeur est une trop grande simplification. En réalité nous observons une diversité de phénotypes variant continûment du phénotype Warburg au phénotype Pasteur. Ainsi nous proposerons en section 3 une EDP structurée en phénotype qui codera toute la variabilité phénotypique d'une population de cellules.

3 EDP structurée en phénotype

L'objectif de cette partie est d'étendre le modèle EDO de la section 2, dans lequel seulement deux phénotypes étaient considérés (Warburg et Pasteur), en développant une équation qui codera toute l'hétérogénéité phénotypique d'une population de cellules, allant du phénotype à dominante glycolitique (Warburg) à un phénotype à dominante Pasteur. Nous confondrons le phénotype avec la fraction de glucose qu'alloue la cellule à la fermentation. Plus précisément, ce qui détermine le phénotype est la valeur μ dans l'expression (2) de ϕ où on rappelle que $\phi_\mu(O_2) = \exp(-\mu O_2)$. Par exemple, dans les modèles précédents, $\mu = 0.005$ représentait un phénotype Warburg tandis que $\mu = 0.347$ représentait un phénotype Pasteur. Nous considérerons ici que ces valeurs de μ seront des phénotypes "extrêmes". Ainsi toute la variabilité phénotypique de la population sera codée par toutes les valeurs de μ comprises entre 0.005 et 0.347. Par souci des conventions des notations nous noterons x la variable phénotypique en lieu et place de μ , aussi appelée *variable de structure*.

On notera $n(t, x)$ la densité de cellules au temps t présentant le phénotype x . Nous décrirons l'évolution des cellules au cours du temps à partir d'une équation générale de la forme :

$$\partial_t n(t, x) + \partial_x(v(x)n(t, x)) - \beta \Delta_x n(t, x) = R(x, \rho(t))n(t, x) \quad (17)$$

où $t > 0$, $x \in [0.005, 0.347]$ représente un phénotype et où $\rho(t) = \int_{0.005}^{0.347} n(t, x) dx$ désigne la densité totale de cellules au temps t . Nous donnons la signification de chacun des termes de l'équation (17) :

1. $\partial_x(v(x)n(t, x))$
Ce terme d'advection modélise l'adaptation phénotypique des cellules à un stress qui intervient en présence d'une drogue, en "poussant" les cellules à adapter leur phénotype en fonction de l'environnement crée par la drogue.
2. $\beta \Delta_x n(t, x)$
Ce terme de diffusion modélise une instabilité épigénétique des cellules.
3. $R(x, \rho(t))n(t, x)$
Ce terme modélise un principe de sélection naturelle. On peut voir la fonction $R(x, \rho(t))$ comme la fonction *fitness* des cellules avec l'expression phénotypique x au temps t .

Notre travail consistera dans un premier temps à construire et à étendre, en ajoutant des variables biologiques pertinentes, notre terme de sélection R . Dans chacune des expressions successives de R interviendra un terme de prolifération $r(x, O_2)$ que nous définirons en section 3.1. Nous étudierons ensuite en section 3.2 l'équation (17) avec $\beta = 0$ et $v(x) = 0$, *i-e* seulement avec le terme de sélection dans le cas le plus simple où $R(x, O_2, \rho(t)) = r(x, O_2) - \rho(t)$. Nous aurons des résultats théoriques (théorème 3.1 en section 3.2.1) ainsi que des résultats numériques (voir figure 30-33). En section 3.3 nous étendrons notre terme de sélection en ajoutant un terme de mort $d(x, h)$ dépendant du pH

extracellulaire $h \in [5.5, 8]$ (voir figure 36 pour son graphe), et nous donnerons les résultats de simulations numériques pour $R(x, O_2, h, \rho(t)) = r(x, O_2) - \rho(t) - d(x, h)$ (voir figure 37-44). Enfin, en section 3.4, nous prendrons en compte la compétition entre cellules pour l'accès au glucose au sein de la tumeur, à travers une fonction ψ , en généralisant les termes de compétition α_{wp} et α_{pw} du modèle EDO Lotka-Volterra de la section 2 ; de la même manière nous donnerons les résultats de simulations numériques pour $R(x, O_2, h) = r(x, O_2) - \int_{0.005}^{0.347} \psi(x, y, O_2) n(t, y) dy - d(x, h)$ (voir figure 45-48). Pour finir, nous ajouterons le terme d'advection, où nous définirons deux vitesses de transport v_1 et v_2 , pour modéliser l'action d'une drogue, et nous donnerons les résultats de simulations numériques pour le terme de sélection le plus complet, à savoir $R(x, O_2, h)$, et deux vitesses de transport v_1 et v_2 .

3.1 Modélisation du taux de de prolifération

Soit $r(x, O_2)$ le taux de prolifération des cellules au phénotype x pour un taux d'oxygène O_2 donné. On suppose, comme en section 2, que celui-ci est proportionnel au taux de production d'ATP, c'est-à-dire proportionnel au nombre d'ATP produits par unité de temps par les cellules au phénotype x . En se basant sur la section 2 on l'écrit comme suit :

$$r(x, O_2) = 1 + \frac{1}{d} \cdot Y^{ATP} \left[C(x) \left(2k_1(x)\phi_x(O_2) + 36k_2(1 - \phi_x(O_2)) \right) \right] \quad (18)$$

où :

- $d := \max_{x, O_2} r(x, O_2) = r(0.005, 0)$ est une constante de normalisation de telle sorte que toutes les valeurs de $r(x, O_2)$ soit comprises entre 0 et 1.
- $Y^{ATP} = 10.5$
- $k_1(x)$ est la vitesse de fermentation des cellules au phénotype x . Nous considérons que plus nous nous approchons d'un phénotype Warburg (x proche de 0.005), plus la vitesse de fermentation k_1 est grande, nécessaire pour compenser le manque d'énergie produit par la respiration mitochondriale. Ainsi on pose

$$k_1(x) = -289x + 101 \text{ où } x \in [0.005, 0.347],$$

de telle sorte que l'on retrouve les valeurs de la section précédente : $k_1(0.005) \simeq 100$ et $k_1(0.347) \simeq 1$

- $\phi_x(O_2)$ représente la portion de glucose allouée à la fermentation. De la même manière, plus nous nous approchons d'un phénotype Warburg, plus la portion de glucose allouée à la fermentation est grande. On pose ainsi

$$\phi_x(O_2) = \exp(-xO_2) \text{ où } x \in [0.005, 0.347], O_2 \in [0, 7].$$

de telle sorte qu'on retrouve encore les valeurs de la section précédente pour $x = 0.005$ et $x = 0.347$.

- $C(x)$ représente la concentration intracellulaire en glucose d'une cellule au phénotype x . En procédant toujours de la même manière on pose

$$C(x) = -26.3x + 10.1315 \text{ où } x \in [0.005, 0.347].$$

tel qu'on ait $C(0.005) \simeq 10$ et $C(0.347) \simeq 1$.

On peut noter plusieurs propriétés du taux prolifération $r(x, O_2)$:

1. $x \rightarrow r(x, O_2)$ est une fonction continue décroissante. En particulier, pour O_2 fixé, le maximum de $r(x, O_2)$ est atteint en $\bar{x} = 0.005$.
2. Il existe des constantes positives m et M tel que

$$m \leq r(x, O_2) \leq M \quad \forall x \in [0.005, 0.347], \forall O_2 \in [0, 7]$$

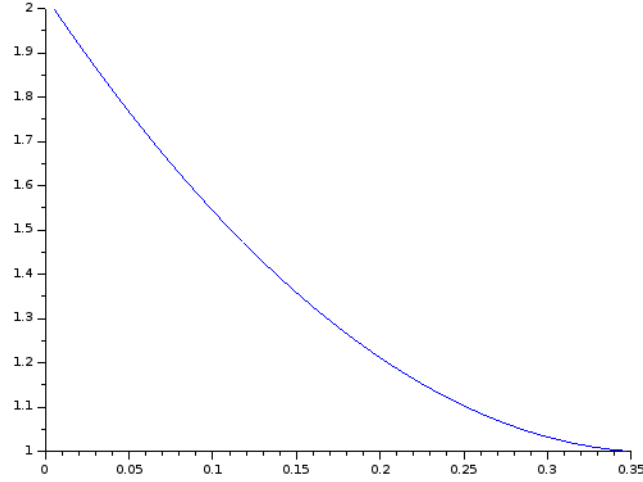


FIGURE 29 – Taux de prolifération $x \rightarrow r(x, O_2)$ pour $O_2 = 3$

3.2 Équation Intégro Différentielle (sélection)

On étudie dans un premier temps l'équation (17) avec $\beta = 0$ et $v(x) = 0$ (seulement avec le terme de sélection) :

$$\begin{cases} \partial_t n(t, x) = [r(x, O_2) - \rho(t)]n(t, x) \text{ où } t \geq 0, x \in [0.005, 0.347], \\ O_2 \in [0, 7] \text{ constante,} \\ n(0, x) = n^0(x), x \in [0.005, 0.347]. \end{cases} \quad (19)$$

où $\rho(t) = \int_{0.005}^{0.347} n(t, x) dx$ et où $r(x, O_2)$ est défini comme ci-dessus.

On peut alors se poser plusieurs questions à propos de (19), auxquelles nous apporterons des réponses aussi bien théoriques (voir théorème 3.1) que numériques (voir section 3.2.2) :

1. Est-ce qu'il y a un phénotype de la population qui est sélectionné ? Si oui, lequel ?
2. Quel est le comportement de l'ensemble de la population ρ au cours du temps ?

3.2.1 Résultats théoriques

Nous étudions théoriquement le système (19) à partir de [18] en donnant le théorème suivant qui permet de répondre aux deux questions posées précédemment.

Théorème 3.1. Soit $\bar{x} = 0.005$ tel que $r(\bar{x}, O_2) = \max_{x \in [0.005, 0.347]} r(x, O_2)$ pour $O_2 \in [0, 7]$ fixé. Alors la solution de (19) satisfait :

$$\begin{aligned}\rho(t) &\rightarrow \bar{\rho} = r(\bar{x}, O_2) \\ n(t, x) &\rightharpoonup r(\bar{x}, O_2)\delta(x - \bar{x})\end{aligned}$$

Autrement dit, **le phénotype sélectionné est celui dont le taux de prolifération est le plus grand**. Pour démontrer ce résultat nous nous basons sur la démonstration de [18] p.29.

Démonstration. On va prouver le premier résultat du théorème 3.1 par double inégalité. Posons

$$N(t, x) = n(t, x) \exp \left(\int_0^t \rho(s) ds \right) \quad (20)$$

Ainsi

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt} N(t, x) &= n(t, x) \frac{d}{dt} \exp \left(\int_0^t \rho(s) ds \right) + \exp \left(\int_0^t \rho(s) ds \right) \frac{d}{dt} n(t, x) \\ &= n(t, x) \rho(t) \exp \left(\int_0^t \rho(s) ds \right) + \exp \left(\int_0^t \rho(s) ds \right) [r(x) - \rho(t)] n(t, x) \\ &= r(x) N(t, x)\end{aligned}$$

à partir duquel nous déduisons $N(t, x) = n^0(x) \exp(r(x)t)$

À partir de (20) on déduit que

$$\frac{d}{dt} \exp \left(\int_0^t \rho(s) ds \right) = \rho(t) \exp \left(\int_0^t \rho(s) ds \right) = \int_{\mathbb{R}} N(t, x) dx = \int_{\mathbb{R}} n^0(x) \exp(r(x)t) dx$$

Ainsi, en intégrant et utilisant Fubini, on trouve

$$\begin{aligned}\exp \left(\int_0^t \rho(s) ds \right) - 1 &= \int_0^t \int_{\mathbb{R}} n^0(x) \exp(r(x)s) dx ds \\ &= \int_{\mathbb{R}} n^0(x) \int_0^t \exp(r(x)s) ds dx \\ &= \int_{\mathbb{R}} \frac{n^0(x)}{r(x)} \exp(r(x)t) dx - \int_{\mathbb{R}} \frac{n^0(x)}{r(x)} dx\end{aligned}$$

Ainsi on a

$$\exp \left(\int_0^t \rho(s) ds \right) = \int_{\mathbb{R}} \frac{n^0(x)}{r(x)} \exp(r(x)t) dx + K$$

où $K = 1 - \int_{\mathbb{R}} \frac{n^0(x)}{r(x)} dx$.

En passant au log on trouve

$$\int_0^t \rho(s) ds = \ln \left(\int_{\mathbb{R}} \frac{n^0(x)}{r(x)} \exp(r(x)t) dx + K \right)$$

Enfin en dérivant cette dernière égalité on trouve que

$$\rho(t) = \frac{\int_{\mathbb{R}} n^0(x) \exp(r(x)t) dx}{\int_{\mathbb{R}} \frac{n^0(x)}{r(x)} \exp(r(x)t) dx + K} \quad (21)$$

où on note que le dénominateur est plus grand que 1.

De (21), on déduit, quand $t \rightarrow \infty$

$$\rho(t) \leq r(\bar{x}) \frac{\int_{\mathbb{R}} \frac{n^0(x)}{r(x)} \exp(r(x)t) dx}{\int_{\mathbb{R}} \frac{n^0(x)}{r(x)} \exp(r(x)t) dx + K} \rightarrow r(\bar{x})$$

car $\int_{\mathbb{R}} \frac{n^0(x)}{r(x)} \exp(r(x)t) dx \rightarrow \infty$, ce qui montre un premier sens de l'inégalité. Pour l'autre sens on définit, pour $\epsilon > 0$, l'ensemble

$$I(\epsilon) = \{x \in \mathbb{R}; \ r(x) \geq r(\bar{x}) - \epsilon\}$$

On obtient alors, en utilisant le fait que $mes(I(\epsilon)) < mes(\mathbb{R})$ où mes désigne la mesure de Lebesgue,

$$\begin{aligned} \rho(t) &\geq \frac{\int_{I(\epsilon)} n^0(x) \exp(r(x)t) dx}{\int_{\mathbb{R}} \frac{n^0(x)}{r(x)} \exp(r(x)t) dx + K} \geq (r(\bar{x}) - \epsilon) \frac{\int_{I(\epsilon)} \frac{n^0(x)}{r(x)} \exp(r(x)t) dx}{\int_{\mathbb{R}} \frac{n^0(x)}{r(x)} \exp(r(x)t) dx + K} \\ &:= (r(\bar{x}) - \epsilon) B_\epsilon(t) \end{aligned}$$

et où $B_\epsilon(t) \rightarrow 1$ quand $t \rightarrow \infty$, ce qui fini de montrer que

$$\rho(t) \rightarrow r(\bar{x}) \text{ quand } t \rightarrow \infty$$

□

3.2.2 Résultats numériques

On pose $R(x, O_2, \rho(t)) = r(x, O_2) - \rho(t)$ tel que $\partial_t n(t, x) = R(x, O_2, \rho(t)) n(t, x)$. On considère un intervalle de temps $[0, T]$ et un maillage régulier $(x_j, t^p) = (j\Delta x, p\Delta t)$, $j = 0, \dots, M$, $p = 0, \dots, N$, où $\Delta x = \frac{0.342}{M}$ dénote le pas d'espace et $\Delta t = \frac{T}{N}$ dénote le pas de temps. On propose alors le schéma explicite-implicite suivant (tiré de [20]) :

$$\frac{n_j^{p+1} - n_j^p}{\Delta t} = R_+(x_j, O_2, \rho^p) n_j^p - R_-(x_j, O_2, \rho^p) n_j^{p+1} \quad (22)$$

où $R_+ := \max(0, R)$, $R_- := \max(0, -R)$ et $\rho^p = \Delta x \sum_{j=0}^P n_j^p$

Nous posons la condition initiale $n_0(x) = \frac{C}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp(-\frac{(x-m)^2}{2\sigma^2})$ avec C une constante de normalisation, $m = 0.15$, $\sigma = 0.02$ et prenons $T = 100$, $M = 100$, $N = 200000$. Nous donnons les résultats numériques en figure 30-33. Nous renvoyons à l'annexe C.1 pour l'implémentation du schéma numérique.

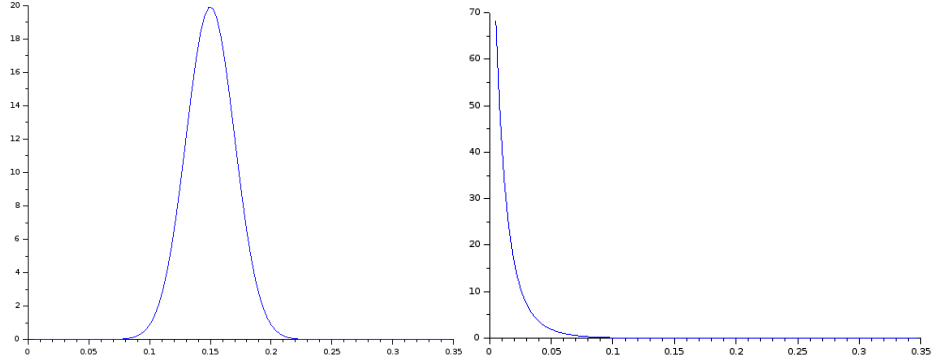


FIGURE 30 – $x \rightarrow n(0, x)$

FIGURE 31 – $x \rightarrow n(T/2, x)$

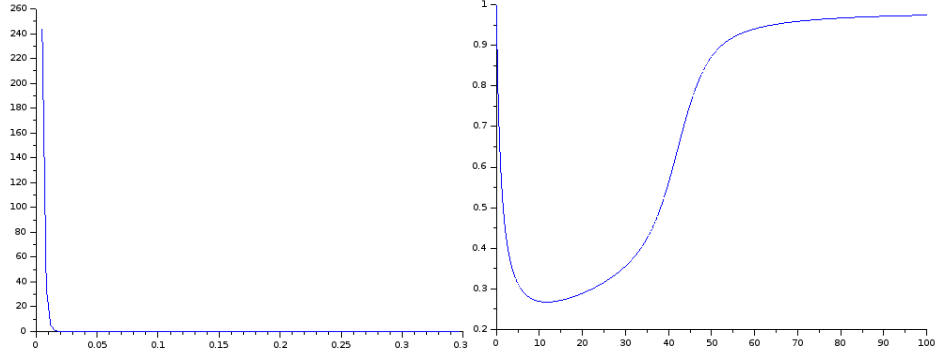


FIGURE 32 – $x \rightarrow n(T, x)$

FIGURE 33 – $t \rightarrow \rho(t)$

Observation : On retrouve bien les résultats théoriques selon lesquels le phénotype le plus Warburg ($x = 0.005$) est sélectionné et où la solution converge vers une dirac en ce point, ainsi que la convergence de la population totale vers 1.

3.3 Terme de mort dépendant du pH

Nous avons précédemment étudié une équation avec un terme de sélection $R(x, O_2, \rho(t)) = r(x, O_2) - \rho(t)$ dépendant seulement du taux d'oxygène O_2 . Nous allons l'étendre en prenant en compte un terme de mort $d(x, h)$ qui dépendra du phénotype x et du pH extracellulaire $h \in [5.5, 8]$ constant. Il prendra la forme suivante :

$$R(x, O_2, h, \rho(t)) = r(x, O_2) - \rho(t) - d(x, h). \quad (23)$$

Comme expliqué en section 1.4.2, l'ensemble des mécanismes de régulation du pHi, en le maintenant normal, adapté à la réalisation de multiples fonctions cellulaires fondamentales, entraîne une acidification du milieu extracellulaire en expulsant les ions H^+ en grande quantité dans celui-ci. Cette acidification du micro-environnement tumoral a pour conséquence la mort des cellules normales, à travers l'expression du facteur de transcription p53, qui ne supportent pas une exposition prolongée à un pHe inférieur à environ 7.1. En revanche, les cellules cancéreuses présentent une mutation de p53 rendant celles-ci beaucoup plus résistantes à un pHe bas ([7], [23], [21], [11]). Ainsi en acidifiant le milieu extracellulaire, les cellules cancéreuses survivent tandis que les cellules saines meurent.

3.3.1 Détermination de l'expression de la fonction $d(x, h)$

Pour exprimer la fonction $d(x, h)$ nous nous basons sur les valeurs expérimentales de [23] qui concernent un adénome (figure 34) et un carcinome colanique humain (figure 35). Nous précisons que la mesure des cellules flottantes (*floating cells*) est vue comme une mesure de l'apoptose des cellules et est exprimée comme un pourcentage de la **population totale**. Nous considérerons que les cellules composant l'adénome sont les cellules au phénotype Pasteur $x = 0.347$ tandis que les cellules composant le carcinome sont les cellules au phénotype Warburg $x = 0.005$.

Nous renvoyons à l'annexe A pour les détails de la construction (consistant en des interpolations linéaires) de la fonction $d(x, h)$ (voir figure 36) et dont nous donnons ici directement l'expression :

$$d(x, h) = \begin{cases} u_{[5.5, 6]}(x, h)/100, & h \in [5.5, 6], x \in [0.005, 0.347] \\ u_{[6, 6.5]}(x, h)/100, & h \in [6, 6.5], x \in [0.005, 0.347] \\ u_{[6.5, 7]}(x, h)/100, & h \in [6.5, 7], x \in [0.005, 0.347] \\ u_{[7, 8]}(x, h)/100, & h \in [7, 8], x \in [0.005, 0.347] \end{cases}$$

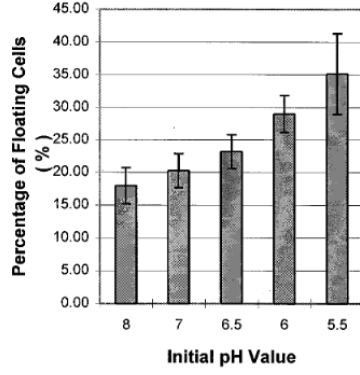


FIGURE 34 – Pourcentage d’apoptose dans la population totale en fonction du pHe dans une population de cellules saines (phénotype Pasteur $x = 0.347$)

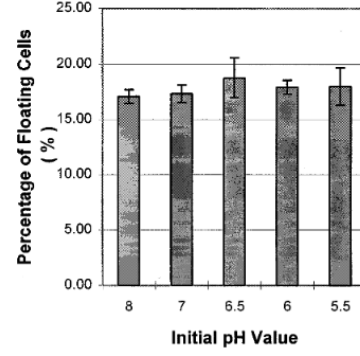


FIGURE 35 – Pourcentage d’apoptose dans la population totale en fonction du pHe dans une population de cellules cancéreuses (phénotype Warburg $x = 0.005$)

où pour $[a, b] := [5.5, 6]$ ou $[a, b] := [6, 6.5]$ ou $[a, b] := [6.5, 7]$ ou $[a, b] := [7, 8]$,

$$u_{[a,b]}(x, h) = \frac{f_{[a,b]}(h) - g_{[a,b]}(h)}{0.342}x + f_{[a,b]}(h) - \frac{0.347}{0.342}(f_{[a,b]}(h) - g_{[a,b]}(h))$$

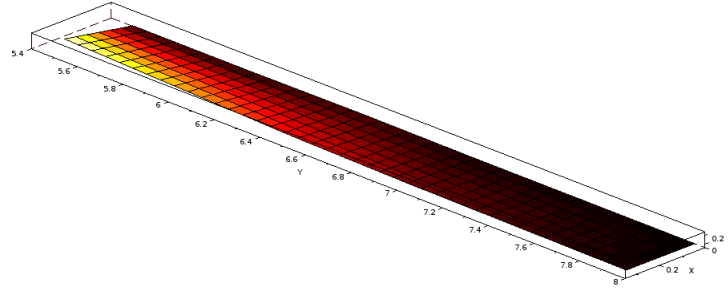


FIGURE 36 – Graphe de la fonction $(x, h) \rightarrow d(x, h)$ en fonction du niveau d’élévation de la surface.

3.3.2 Résultats numériques

Nous utilisons le même schéma numérique (3.5.2) avec le terme de sélection (23). On donne dans un premier temps les résultats pour $h = 5.7$ en figure 37-40 puis, dans un second temps, pour $h = 7.5$ en figure 41-44. Nous renvoyons à l’annexe C.2 pour l’implémentation du schéma numérique.

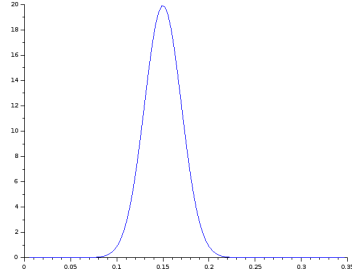


FIGURE 37 – $x \rightarrow n(0, x)$

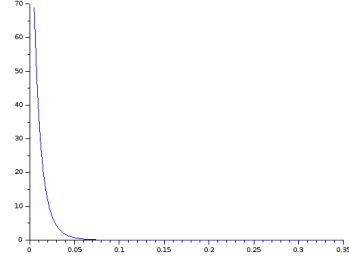


FIGURE 38 – $x \rightarrow n(T/2, x)$, $h = 5.7$

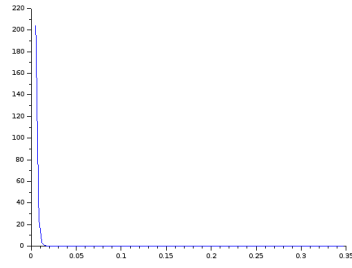


FIGURE 39 – $x \rightarrow n(T, x)$, $h = 5.7$

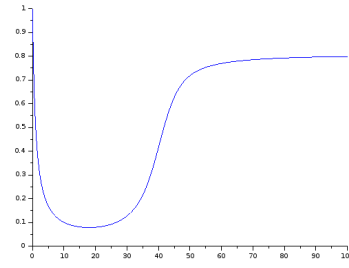


FIGURE 40 – $t \rightarrow \rho(t)$, $h = 5.7$

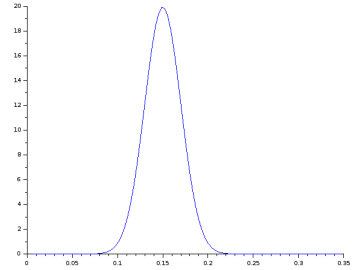


FIGURE 41 – $x \rightarrow n(0, x)$

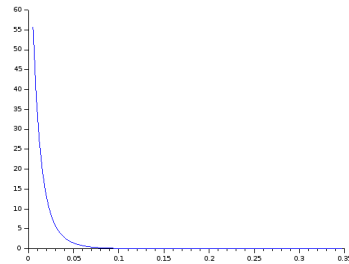


FIGURE 42 – $x \rightarrow n(T/2, x)$, $h = 7.5$

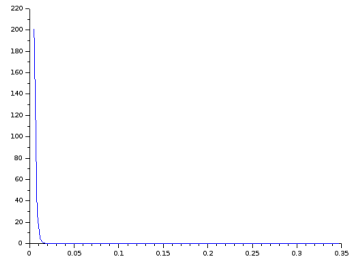


FIGURE 43 – $x \rightarrow n(T, x)$, $h = 7.5$

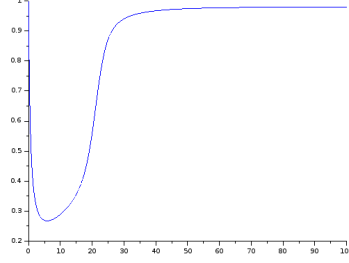


FIGURE 44 – $t \rightarrow \rho(t)$, $h = 7.5$

3.4 Ajout d'un terme modélisant la compétition pour l'accès au glucose

Il s'agit ici de prendre en compte la compétition entre cellules pour l'accès au glucose au sein de la tumeur, en généralisant les termes de compétition α_{wp} et α_{pw} intervenant dans le modèle EDO Lotka-Volterra de la section 2.

Notre équation va alors prendre la forme suivante :

$$\begin{cases} \partial_t n(t, x) = [r(x, O_2) - \int_{0.005}^{0.347} \psi(x, y, O_2) n(t, y) dy - d(x, h)] n(t, x), \\ O_2 = \text{cte} \end{cases} \quad (24)$$

où

$$\psi(x, y, O_2) = \frac{1}{c} \cdot \frac{C(y)[k_1(y)\phi_y(O_2) + k_2(1 - \phi_y(O_2))]}{C(x)[k_1(x)\phi_x(O_2) + k_2(1 - \phi_x(O_2))]}$$

où $c := \max_{x, y, O_2} \psi(x, y, O_2) = \psi(0.347, 0.005, 0)$ est une constante de normalisation permettant, comme la constante d pour le taux de prolifération $(x, O_2) \rightarrow r(x, O_2)$, de ramener les valeurs de ψ entre 0 et 1.

Simulations numériques : Nous utilisons toujours le même schéma numérique (3.5.2) avec comme terme de sélection

$$R(x, O_2, h) = r(x, O_2) - \int_{0.005}^{0.347} \psi(x, y, O_2) n(t, y) dy - d(x, h)$$

Nous renvoyons à l'annexe C.3 pour l'implémentation du schéma numérique et nous donnons les résultats des simulations en figure 45-48 pour $h = 6.5$.

3.5 Ajout d'un terme thérapeutique

On étend l'équation (24) en ajoutant le terme d'advection modélisant l'action d'une drogue entraînant un stress cellulaire et obligeant les cellules à adapter leur phénotype.

$$\begin{cases} \partial_t n(t, x) + \partial_x(v(x)n(t, x)) = R(x, O_2, h)n(t, x), \\ O_2 \in [0, 7] \text{ constante}, \\ n(0, x) = n^0(x), \quad x \in [0.005, 0.347], \\ n(t, 0.005) = 0, \quad t > 0, \end{cases} \quad (25)$$

où $t > 0, x \in [0.005, 0.347]$,

$$R(x, O_2, h) = r(x, O_2) - \int_{0.005}^{0.347} \psi(x, y, O_2) n(t, y) dy - d(x, h)$$

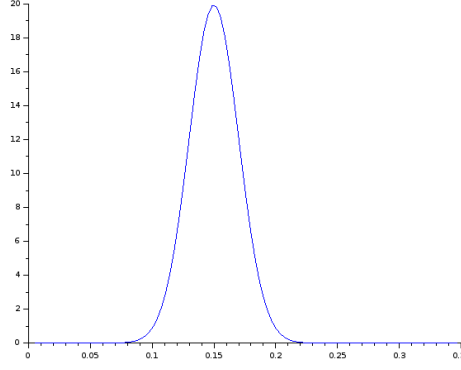


FIGURE 45 – $x \rightarrow n(0, x)$

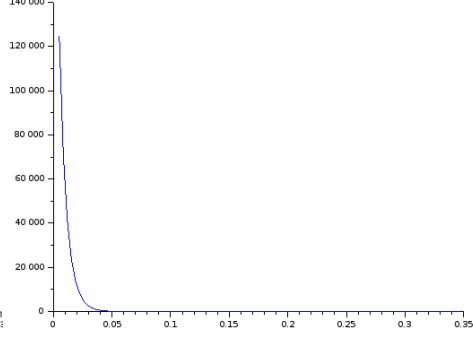


FIGURE 46 – $x \rightarrow n(T/2, x)$, $h = 6.5$

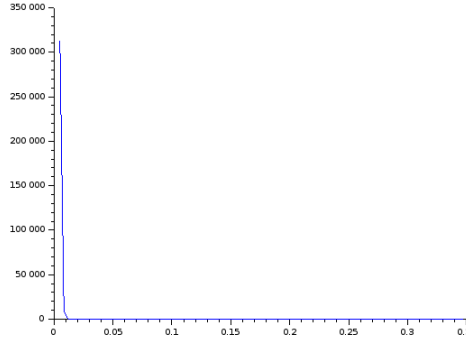


FIGURE 47 – $x \rightarrow n(T, x)$, $h = 6.5$

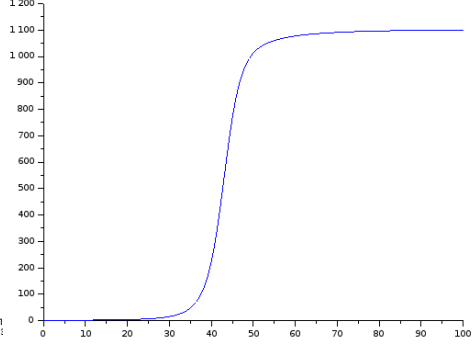


FIGURE 48 – $t \rightarrow \rho(t)$, $h = 6.5$

Nous proposons ici, par exemple, que le terme d'advection modélise l'action de blocage des mécanismes de régulation du pHi (comme décrit en section 1.6) de telle sorte qu'en inhibant l'export des acides hors de la cellule le pH intracellulaire de cette dernière va décroître et entraîner l'apoptose. On rappelle que les auteurs de [14] sont convaincus qu'en bloquant les mécanismes de régulation du pHi seul les cellules aux phénotypes Warburg seront impactées. On propose les deux termes de vitesse de transport $v_i(x)$, $i = 1, 2$, suivant :

$$v_1(x) = 0.347 - x, \quad x \in [0.005, 0.347]$$

$$v_2(x) = (0.347 - x)^2, \quad x \in [0.005, 0.347]$$

On voit que $v_1(x) \geq v_2(x)$ pour tout $x \in [0.005, 0.347]$, ce qui traduit le fait que v_1 modélise un stress exercé plus grand sur les cellules cancéreuses que v_2 .

Nous allons simuler en section 3.5.1 l'action du terme de transport (sans le terme de sélection) et nous justifierons le choix des conditions aux bords. Ensuite, en section 3.5.2, nous proposerons un schéma de splitting (tiré de [20]) pour simuler l'équation avec le terme de transport et de sélection.

3.5.1 Simulations numériques terme de transport

Nous simulons dans un premier temps l'équation suivante :

$$\begin{cases} \partial_t n(t, x) + \partial_x(v_i(x)n(t, x)) = 0, & t > 0, \quad x \in [0.005, 0.347], \quad i = 1, 2, \\ n(0, x) = n^0(x), & x \in [0.005, 0.347], \\ n(t, 0.005) = 0, & t > 0. \end{cases} \quad (26)$$

La condition au bord de Dirichlet se détermine de telle manière qu'on assure la conservation de la masse. En effet si on intègre (26) on a

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \int_{0.005}^{0.347} n(t, x) dx &= - \int_{0.005}^{0.347} \partial_x(v_i(x)n(t, x)) dx \\ &= -v_i(0.347)n(t, 0.347) + v_i(0.005)n(t, 0.005) \\ &= 0 \end{aligned}$$

où on a utilisé que $v_i(0.347) = 0$ pour $i = 1, 2$, ainsi que la condition au bord de Dirichlet.

Schéma numérique : Nous proposons le schéma numérique explicite suivant, pour $i = 1, 2$:

$$\frac{n_j^{p+1} - n_j^p}{\Delta t} = - \frac{v_i(x_j)n_j^p - v_i(x_{j-1})n_{j-1}^p}{\Delta x}$$

pour tout $1 \leq j \leq M$. Le schéma est stable si la condition CFL suivante est vérifiée :

$$\|v\|_{L^\infty} \frac{\Delta t}{\Delta x} < 1.$$

Nous renvoyons à l'annexe C.4 pour l'implémentation du schéma numérique et donnons les résultats des simulations en figure 50-51 pour la vitesse de transport v_1 et en figure 52-53 pour la vitesse de de transport v_2 :

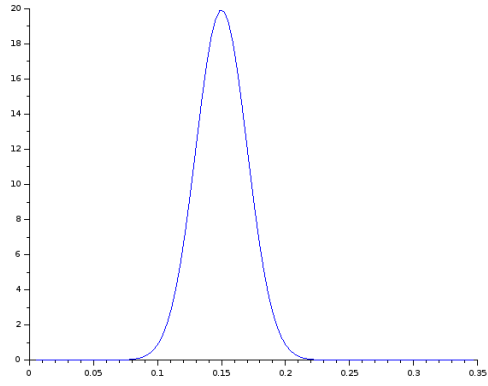


FIGURE 49 – $x \rightarrow n(0, x)$

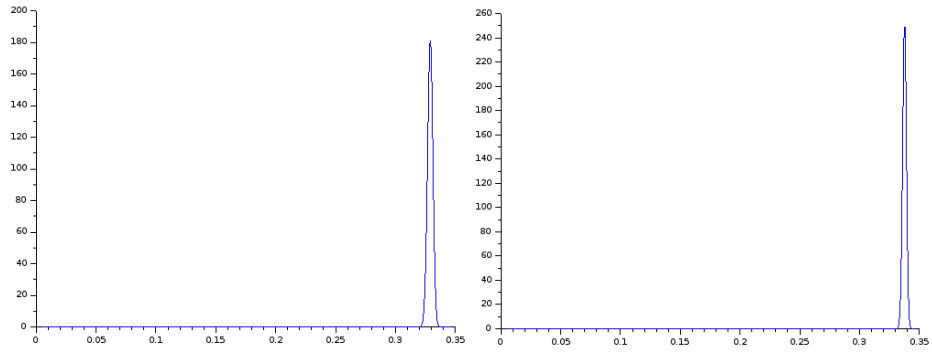


FIGURE 50 – $x \rightarrow n(T/2, x)$ pour v_1

FIGURE 51 – $x \rightarrow n(T, x)$ pour v_1

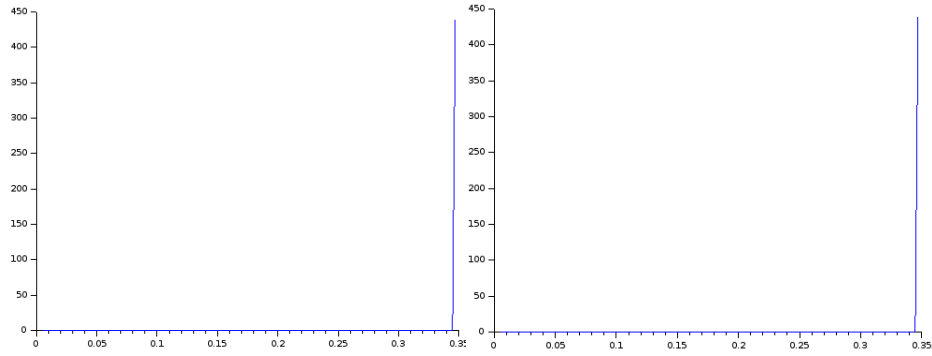


FIGURE 52 – $x \rightarrow n(T/2, x)$ pour v_2

FIGURE 53 – $x \rightarrow n(T, x)$ pour v_2

Observation : Le terme de transport modélise bien l'action d'un agent thérapeutique visant les cellules Warburg en les poussant à adapter leur phénotype. On remarque aussi que v_2 modélise un stress plus grand que v_1 en poussant plus fortement la population vers la droite.

3.5.2 Simulations numériques terme de transport + sélection

Nous simulons à présent l'équation (25) en utilisant le schéma de splitting suivant (toujours tiré de [20]) :

$$\frac{n_j^{p+\frac{1}{2}} - n_j^p}{\Delta t} = - \frac{v_i(x_j)n_j^p - v_i(x_{j-1})n_{j-1}^p}{\Delta x}$$

$$\frac{n_j^{p+1} - n_j^{p+\frac{1}{2}}}{\Delta t} = R_+(x_j, O_2, h, \rho^{p+\frac{1}{2}})n_j^p - R_-(x_j, O_2, h, \rho^{p+\frac{1}{2}})n_j^{p+1}$$

où $\rho^{p+\frac{1}{2}} = \Delta x \sum_{j=0}^P n_j^{p+\frac{1}{2}}$

Nous renvoyons à l'annexe C.5 pour l'implémentation du schéma numérique et au figure 54-57 pour les résultats des simulations numériques pour v_1 et au figure 58-61 pour v_2 .

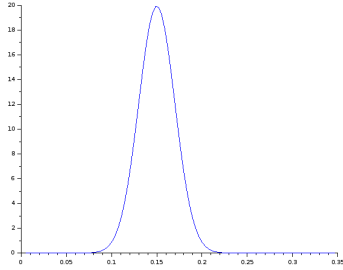


FIGURE 54 – $x \rightarrow n(0, x)$

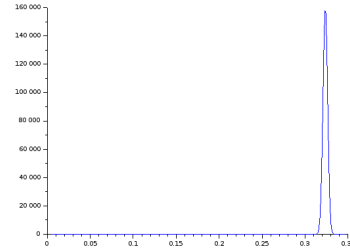


FIGURE 55 – $x \rightarrow n(T/2, x)$, $h = 6.5$

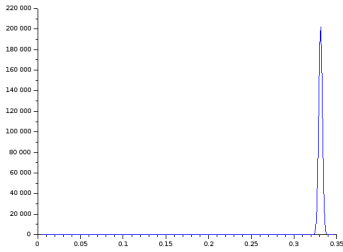


FIGURE 56 – $x \rightarrow n(T, x)$, $h = 6.5$

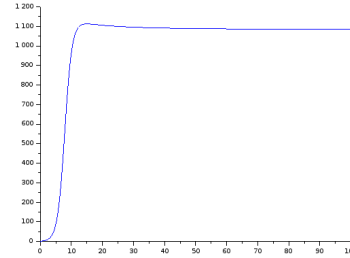


FIGURE 57 – $t \rightarrow \rho(t)$, $h = 6.5$

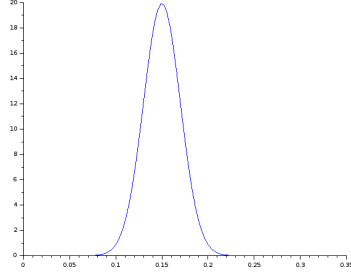


FIGURE 58 – $x \rightarrow n(0, x)$

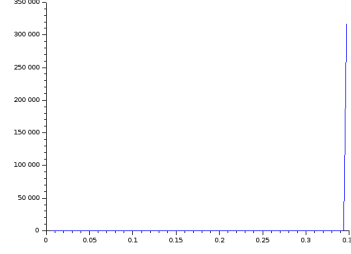


FIGURE 59 – $x \rightarrow n(T/2, x)$, $h = 6.5$

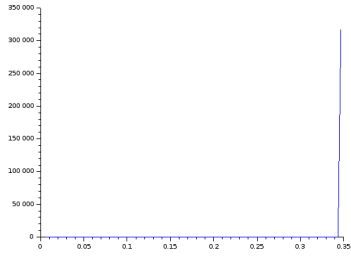


FIGURE 60 – $x \rightarrow n(T, x)$, $h = 6.5$

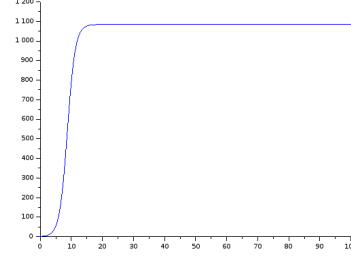


FIGURE 61 – $t \rightarrow \rho(t)$, $h = 6.5$

Observation : Nous voyons que dans les deux cas le stress induit par la drogue est suffisamment grand pour entraîner la sélection d'un phénotype Pasteur ($x \simeq 0.347$). On observe aussi encore que le stress induit par v_2 est plus fort que v_1 et que la convergence de n vers une Dirac en $x \simeq 0.347$ est plus rapide dans le cas v_2 ; où nous avons fixé $h = 6.5$ dans les deux cas.

Conclusion

Dans un premier temps nous avons décrit les différents mécanismes cellulaires inhérents aux cellules cancéreuses et opérant au sein d'une tumeur, et dont nous nous sommes servi dans notre travail de modélisation. Dans un second temps nous avons étendu le modèle Lotka-Volterra *discret* proposé par Gravenmier et al dans [5] en un modèle EDO *continu* à partir duquel nous avons retrouvé et démontré les résultats fondamentaux de [5], à savoir :

1. sélection des cellules Warburg en condition extrême d'oxygène et sélection des cellules Pasteur en condition intermédiaire d'oxygène (théorème 2.1).
2. sélection des cellules Warburg lorsque l'*amplitude* des variations en oxygène est assez grande (section 2.3).

Ensuite nous avons pris en compte le mécanisme de recyclage du lactate par les cellules Pasteur oxygénées de la tumeur pour alimenter la respiration mitochondriale, permettant ainsi une coexistence des deux populations seulement en condition extrême d'oxygène (proposition 2.1). L'une des limites de notre modèle EDO est l'hypothèse que nous avons faite selon laquelle la concentration en oxygène est uniforme dans toute la tumeur, ce qui n'est pas conforme aux observations expérimentales. En effet on observe au sein de celle-ci des zones fortement oxygénées tandis que d'autres le sont très peu. Une extension nécessaire et souhaitable du modèle EDO est alors un modèle EDP dans lequel nous pourrions prendre en compte une composante spatiale qui permettrait de décrire l'hétérogénéité en oxygène au sein de la tumeur. Enfin, nous avons étendu le modèle EDO dans lequel seulement deux phénotypes étaient considérés, en un modèle EDP dans lequel toute la variabilité phénotypique d'une tumeur était présente, allant du phénotype Warburg au phénotype Pasteur ; nous avons vu alors que le phénotype le plus Warburg $x = 0.005$ était systématiquement sélectionné. Nous avons fini en introduisant un terme d'advection modélisant l'action d'une drogue exerçant un stress cellulaire sur les cellules Warburg, les poussant à adapter leur phénotype ; de cette manière nous avons vu que le stress était suffisamment grand pour que les cellules Pasteur ($x \simeq 0.347$) soient finalement sélectionnées.

Pour finir, j'exprime un grand remerciement à Jean CLAIRAMBAULT à plusieurs égards. Tout d'abord pour m'avoir proposé ce sujet de stage qui aura été Ô combien intéressant et enrichissant, bien au-delà même du cadre dans lequel il a été effectué. Aussi un merci infini pour sa grande disponibilité et les nombreuses discussions fructueuses qui m'ont permis de mener à bien ce stage et de me nourrir de ses connaissances étendues. Enfin, un très grand remerciement à Diane PEURICHARD et Camille POUCHOL pour leurs aides ponctuelles mais tout à fait précieuses, sans qui je n'aurais pu proposer ce que j'ai proposé dans ce rapport. Un très grand merci à vous.

A Détails de la construction de la fonction $d(x, h)$

Nous commençons par interpoler linéairement les valeurs de la figure 34 (cellules Pasteur), à savoir $(5.5, 35)$, $(6, 29)$, $(6.5, 23)$, $(7, 20)$ et $(8, 17)$. Nous donnons l'expression de chacune des interpolations, où on note $f_{[a,b]}$ la fonction linéaire d'interpolation des points a et b pour les cellules Pasteur :

$$\begin{cases} f_{[5.5,6.5]}(h) = -12h + 101, & h \in [5.5, 6.5], \\ f_{[6.5,7]}(h) = -6h + 62, & h \in [6.5, 7], \\ f_{[7,8]}(h) = -3h + 41, & h \in [7, 8]. \end{cases} \quad (27)$$

De la même manière nous interpolons les valeurs de la figure 35 (cellules Warburg), à savoir $(5.5, 17.7)$, $(6, 17.5)$, $(6.5, 18.2)$, $(7, 17.3)$ et $(8, 17)$. Nous notons ici $g_{[a,b]}$ la fonction linéaire d'interpolation des points a et b pour les cellules Warburg :

$$\begin{cases} g_{[5.5,6]}(h) = -0.4h + 19.9, & h \in [5.5, 6], \\ g_{[6,6.5]}(h) = 1.4h + 9.1, & h \in [6, 6.5], \\ g_{[6.5,7]}(h) = -1.8h + 29.9, & h \in [6.5, 7], \\ g_{[7,8]}(h) = -0.3h + 19.4, & h \in [7, 8]. \end{cases} \quad (28)$$

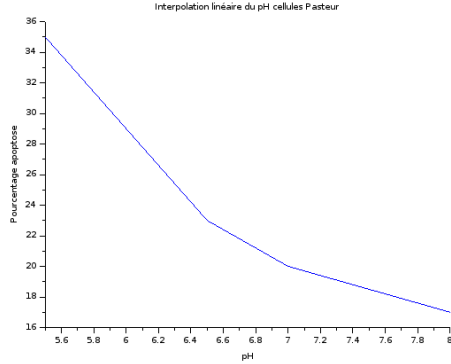


FIGURE 62 – Fonction d'interpolation cellule Pasteur

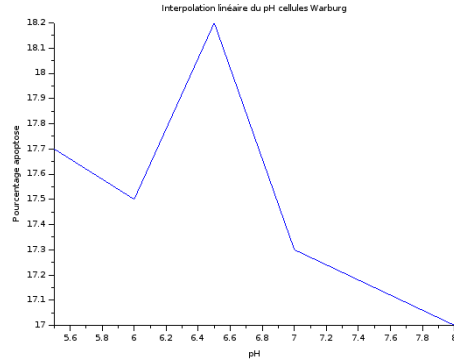


FIGURE 63 – Fonction d'interpolation cellule Warburg

Nous pouvons déduire dans un premier temps le terme de mort $d(x, h)$ dépendant

du pH pour les cellules au phénotype $x = 0.005$ et $x = 0.347$, comme suit :

$$d(0.005, h) = \begin{cases} g_{[5.5, 6]}(h)/100, & \text{si } h \in [5.5, 6], \\ g_{[6, 6.5]}(h)/100, & \text{si } h \in [6, 6.5], \\ g_{[6.5, 7]}(h)/100, & \text{si } h \in [6.5, 7], \\ g_{[7, 8]}(h)/100, & \text{si } h \in [7, 8]. \end{cases}$$

$$d(0.347, h) = \begin{cases} f_{[5.5, 6]}(h)/100, & \text{si } h \in [5.5, 6.5], \\ f_{[6.5, 7]}(h)/100, & \text{si } h \in [6.5, 7], \\ f_{[7, 8]}(h)/100, & \text{si } h \in [7, 8]. \end{cases}$$

Pour obtenir le terme de mort pour l'ensemble des phénotypes compris entre 0.005 et 0.347, nous allons interpoler les x pour h fixé. On note cette fonction d'interpolation

$$u_{[a, b]}(x, h) \text{ avec } h \in [a, b], x \in [0.005, 0.347].$$

Détaillons son expression pour un $h \in [7, 8]$.

Comme $u_{[7, 8]}$ est une fonction affine et s'écrit sous la forme $ax + b$, avec a et b à déterminer, on a

$$u_{[7, 8]}(0.005, h) = 0.005a + b = g_{[7, 8]}(h)$$

$$u_{[7, 8]}(0.347, h) = 0.347a + b = f_{[7, 8]}(h)$$

En soustrayant les deux relations précédentes et en remplaçant on trouve que

$$a = \frac{f_{[7, 8]}(h) - g_{[7, 8]}(h)}{0.342}, \quad b = f_{[7, 8]}(h) - \frac{0.347}{0.342}(f_{[7, 8]}(h) - g_{[7, 8]}(h))$$

de telle sorte que $\forall h \in [7, 8]$ et $\forall x \in [0.005, 0.347]$

$$u_{[7, 8]}(x, h) = \frac{f_{[7, 8]}(h) - g_{[7, 8]}(h)}{0.342}x + f_{[7, 8]}(h) - \frac{0.347}{0.342}(f_{[7, 8]}(h) - g_{[7, 8]}(h))$$

On retrouve bien $u_{[7, 8]}(0.005, 7) = 17.3 = g_{[7, 8]}(7)$ et $u_{[7, 8]}(0.347, 7) = 20 = f_{[7, 8]}(7)$

On déduit l'expression de $u_{[5.5, 6]}$, $u_{[6, 6.5]}$ et $u_{[6.5, 7]}$ en procédant de la même manière et on a alors, pour $[a, b] := [5.5, 6]$ ou $[a, b] := [6, 6.5]$ ou $[a, b] := [6.5, 7]$,

$$u_{[a, b]}(x, h) = \frac{f_{[a, b]}(h) - g_{[a, b]}(h)}{0.342}x + f_{[a, b]}(h) - \frac{0.347}{0.342}(f_{[a, b]}(h) - g_{[a, b]}(h))$$

On déduit alors l'expression générale de la fonction $d(x, h)$:

$$d(x, h) = \begin{cases} u_{[5.5, 6]}(x, h)/100, & h \in [5.5, 6], x \in [0.005, 0.347] \\ u_{[6, 6.5]}(x, h)/100, & h \in [6, 6.5], x \in [0.005, 0.347] \\ u_{[6.5, 7]}(x, h)/100, & h \in [6.5, 7], x \in [0.005, 0.347] \\ u_{[7, 8]}(x, h)/100, & h \in [7, 8], x \in [0.005, 0.347] \end{cases}$$

B Code numérique Lotka-Volterra EDO

B.1 Lotka-Volterra compétition avec taux d'oxygène constant

```
1 Cw = 10; //Capacité de transport des cellules Warburg
2 Cp = 1; //Capacité de transport des cellules Pasteur
3 q1 = 100; // Vitesse de la fermentation
4 q2 = 1; // Vitesse de la respiration
5 YATP = 10.5 ;
6 K = 100000; //Carrying capacity commune aux deux populations
7
8
9 //Coefficients de compétitions pour le glucose
10 function y=apw(O)
11     jw = 10*(100*exp(-0.005*O)+(1-exp(-0.005*O)))
12     jp = 100*exp(-0.347*O)+(1-exp(-0.347*O))
13     y = jw./jp
14 endfunction
15
16 function y=awp(O)
17     jw = 10*(100*exp(-0.005*O)+(1-exp(-0.005*O)))
18     jp = 100*exp(-0.347*O)+(1-exp(-0.347*O))
19     y = jp./jw
20 endfunction
21
22
23 // Phi des cellules Warburg
24 function y=phiw(O)
25     y = exp(-0.005*O)
26 endfunction
27
28 // Phi des cellules Pasteur
29 function y=phip(O)
30     y = exp(-0.347*O)
31 endfunction\\
32
33
34
35 //Taux de prolifération des cellules Warburg
36 function y=rw(O)
37     n = Cw*(2*q1*phiw(O) + 36*q2*(1-phiw(O)))
38     y = YATP*n
39 endfunction
40
41 // Taux de prolifération des cellules Pasteur
```



```

42 function y=rp(O)
43     n = Cp*(2*phiw(O) + 36*(1-phiw(O)))
44     y = YATP*n
45 endfunction
46
47 //Carrying capacity relatives des cellules Warburg et Pasteur
48 function y=Aw(O)
49     y = (1 ./K)*( 2 .*phip(O)+36 .* (1-phip(O))) ./ (2 .*phiw(O)+36 .* (1-phiw(O))) )
50 endfunction\
51
52 function y=Ap(O)
53     y = (1 ./K)*( (2*phiw(O)+36*(1-phiw(O))) ./ (2*phip(O)+36*(1-phip(O))) )
54 endfunction
55
56 //Fonctions
57 function y=fwp(O)
58     y=(awp(O).*Aw(O) ./Ap(O))
59 endfunction
60
61 function y=gwp(O)
62     y=fwp(O)-1
63 endfunction
64
65 function y=fpw(O)
66     y=apw(O).*Ap(O) ./Aw(O)
67 endfunction
68
69 function y=gpw(O)
70     y=fpw(O)-1
71 endfunction
72
73 m=fsolve(0,gwp)
74 n=fsolve(0,gpw)

```

B.2 Avec la fonction ODE

```

1 O=3;
2
3 function [xdot]=LV(t,x)
4     xdot(1)=rw(O)*x(1)*(1-Aw(O)*x(1)-awp(O)*Aw(O)*x(2));
5     xdot(2)=rp(O)*x(2)*(1-Ap(O)*x(2)-apw(O)*Ap(O)*x(1));
6 endfunction
7
8 t0=0;

```

```

9  t=0:0.0002:10;
10 x=ode([1;100],t0,t,LV);
11 x1=x(1,:);
12 x2=x(2,:);
13 plot2d(t,x1,2);
14 plot2d(t,x2,3);
15 legends(['$n_w$','$n_p$'],[2,3],6)
16 xtitle('$\mbox{Condition initiale: } (n_{w}^0,n_{p}^0)=(1,100)\mbox{ } T=10\mbox{ } O_{2}=\textbf{8}$','$t$','$n_w(t),n_p(t)$')

```

B.3 Avec une méthode Runge-Kutta d'ordre 4

```

1  O=3;
2
3  function ndot=F(t,N)
4      ndot=zeros(2,1); //définition de la taille
5      ndot(1)=rw(O)*N(1)*(1-Aw(O)*N(1)-awp(O)*Aw(O)*N(2));
6      ndot(2)=rp(O)*N(2)*(1- Ap(O)*N(2)-apw(O)*Ap(O)*N(1));
7  endfunction\
8
9  function [nRK,t]=LVrk(n,T)
10     dt=T/n;
11     t=[0:n]*dt;
12
13     nRK=zeros(2,n+1);
14     nRK(1,1)=1; nRK(2,1)=100;
15
16     for i=1:n
17         k1=F(t(i),nRK(:,i));
18         k2=F(t(i)+dt/2,nRK(:,i)+dt*k1/2);
19         k3=F(t(i)+dt/2,nRK(:,i)+dt*k2/2);
20         k4=F(t(i)+dt,nRK(:,i)+dt*k3);
21         RK(:,i+1)=nRK(:,i)+dt*(k1+2*k2+2*k3+k4)/6;
22     end
23 endfunction
24
25 [nRK,t]=LVrk(20000,0.5);
26 plot2d(t,nRK(1,:),2);
27 plot2d(t,nRK(2,:),3);
28 legends(['$n_w$','$n_p$'],[2,3],6)
29 xtitle('$\mbox{Espace des phases avec condition initiale: } (n_{w}^0,n_{p}^0)=(1,100)\mbox{ } \textbf{et } O_{2}=3$','$n_w$','$n_p$')

```

B.4 Lotka-Volterra compétition avec stochasticité de l'oxygène

```

1 function ndot=F(t,N,O)
2     ndot=zeros(2,1); // définition de la taille
3     ndot(1)=rw(O)*N(1)*(1-Aw(O)*N(1)-awp(O)*Aw(O)*N(2));
4     ndot(2)=rp(O)*N(2)*(1-Ap(O)*N(2)-apw(O)*Ap(O)*N(1));
5 endfunction\\
6
7 function [nRK,t]=LVrk(n,T)
8     dt=T/n;
9     t=[0:n]*dt;
10
11     nRK=zeros(2,n+1);
12     nRK(1,1)=1; nRK(2,1)=100;
13
14     for i=1:n
15         o=grand(1,1,'nor',3,1);
16         if o$>$8 then
17             o=8;
18         elseif o$<$0 then
19             o=0;
20         end
21         k1=F(t(i), nRK(:,i), o);
22         k2=F(t(i)+dt/2, nRK(:,i)+dt*k1/2, o);
23         k3=F(t(i)+dt/2, nRK(:,i)+dt*k2/2, o);
24         k4=F(t(i)+dt, nRK(:,i)+dt*k3, o);
25         nRK(:,i+1)=nRK(:,i)+dt*(k1+2*k2+2*k3+k4)/6;
26     end
27 endfunction
28
29 [nRK,t]=LVrk(100000,1);
30 plot2d(t,nRK(1,:),2);
31 plot2d(t,nRK(2,:),3);
32 legends(["$n_w$","$n_p$"],[2,3],6)
33 xtitle("$(n_w)^0, (n_p)^0=(1,100), \text{--} T=5 \text{--} \mu, \sigma=(3,3)$", "$t$", "$n_w(t), n_p(t)$")

```

C Code numérique EDP structurée

```
1 YATP = 10.5;
2 k2 = 1; //Vitesse de fermentation de la respiration
3 K = 1000000; //Carrying capacity
4
5 //Fonction vitesse de fermentation
6 function y=k1(x)
7     y=-289.*x+101;
8 endfunction
9
10 //Fonction d'allocation de la proportion de glucose à la fermentation
11 function y=phi(x,O)
12     y=exp(-x.*O);
13 endfunction
14
15 //Fonction donnant la concentration intracellulaire en glucose
16 function y=C(x)
17     y=-26.3.*x+10.1315
18 endfunction
19
20 //Taux de prolifération
21 function y=r(x,O)
22     y=YATP.*C(x).*( 2.*k1(x).*phi(x,O) + 36.*k2.*(1-phi(x,O)) );
23 endfunction
24
25 //Conditions initiales gaussienne où m est la moyenne et s la variance
26 function y=uini2(x)
27     m=0.15; s=0.02;
28     u=[0:0.01:1];
29     C=integrate('exp(-(u-m).*(u-m)/(2*s*s))/(s*sqrt(2*pi))','u',0,1)
30     y=exp(-(x-m).*(x-m)/(2*s*s))/(s*sqrt(2*pi))/C
31 endfunction
32
33 // Vitesse de transport linéaire
34 function y=v1(x)
35     y=(0.347-x)
36 endfunction
37
38 // Vitesse de transport parabolique
39 function y=v2(x)
40     y=(0.347-x).*(0.347-x)
41 endfunction
```

C.1 Schéma numérique terme de sélection

```

1  //Schéma numérique sans mémoire
2
3  function [n,x,t,rho]=sel(N,M,T,O)
4      dx=(0.347-0.005)/M;
5      x=[0.005:dx:0.347];
6      J=length(x);
7
8      dt=T/P;
9      t=[0:dt:T];
10
11
12     n=[];
13     v=[];
14     rho=[];
15
16     //Initialisation du schéma par la condition initiale
17     for j=1:J
18         v(j)=uini2(x(j));
19     end
20
21     //Implémentation du schéma
22     for p=1:P
23         rho(p)=dx*sum(v(:))
24         for j=1:J
25             n(j)=[ (1+dt*max(0,r2(x(j),O)-rho(p))) / (1+dt*max(0,-r2(x(j),O)+rho(p))) ]*v(j)
26         end
27         v=n;
28         if p==int(N/2) then
29             plot2d(x,n(:,2))
30         end
31     end
32 endfunction
33
34 [n,x,t,rho]=sel(80000,100,100,5)
35 //plot2d(x,n(:,2))

```

C.2 Schéma numérique terme de sélection avec terme de mort

```

1  //Schéma numérique sans mémoire
2  h=7.5;
3
4  function [n,x,t,rho]=selmort(N,M,T,O)
5
6      dx=(0.347-0.005)/M;
7      x=[0.005:dx:0.347];
8      J=length(x);
9
10     dt=T/P;
11     t=[0:dt:T];
12
13
14     n=[];
15     v=[];
16     rho=[];
17
18     //Initialisation du schéma par la condition initiale
19     for j=1:J
20         v(j)=uini2(x(j));
21     end
22
23     //Implémentation du schéma
24     for p=1:P
25         rho(p)=dx*sum(v(:))
26         for j=1:J
27             n(j)=[ (1+dt*max(0,r2(x(j),O)-rho(p)-d(x(j),h))) / (1+dt*max(0,-r2(x(j),O)+rho(p)+d(x(j),h)
28                 ))) ]*v(j)
29         end
30         v=n;
31         if p==int(N/2) then
32             plot2d(x,n(:,2))
33         end
34     end
35 endfunction
36
37 [n,x,t,rho]=selmort(80000,100,100,5)
38 //plot2d(x,n(:,2))
39 //plot2d(t,rho,2)

```

C.3 Schéma numérique terme de sélection avec terme de mort + terme de compétition

```

1 h=6.5
2
3 function [n,x,t,rho]=EDPs(N,M,T,O)
4
5     dx=(0.347-0.005)/M;
6     x=[0.005:dx:0.347];
7     y=[0.005:dx:0.347];
8     J=length(x);
9
10    dt=T/N;
11    t=[0:dt:T];
12
13    n=[];
14    v=[];
15    rho=[];
16
17    //Initialisation du schéma par la condition initiale
18    for j=1:J
19        v(j)=uini2(x(j));
20    end
21
22    //Implémentation du schéma
23    for p=1:N
24        rho(p)=dx*sum(v(:))
25        for j=1:J
26            f=dx*sum(psi2(x(j),y,O)*v(:))
27            n(j)=[ (1+dt*max(0,r2(x(j),O)-f-d(x(j),h))) / (1+dt*max(0,-r2(x(j),O)+f+d(x(j),h))) ]*v(j)
28        end
29        v=n;\
30        if p==int(N/2) then
31            plot2d(x,n(:),2)
32        end
33    end
34
35 endfunction
36
37 [n,x,t,rho]=EDPs(100000,100,100,5)
38 //plot2d(t,rho,2)

```

C.4 Implémentation schéma numérique terme de transport

```

1 function [n,x,P]=trans(N,T)
2     dt=T/N;
3     t=[0:dt:T];
4     P=length(t);
5
6     dx=2*dt*abs(v1(0.005));
7     x=[0.005:dx:0.347];
8     J=length(x);
9
10    n=[];
11    v=[];
12
13    //Initialisation du schéma par la condition initiale uini2
14    for j=1:J
15        v(j)=uini2(x(j));
16    end
17
18    f=dt/dx;
19
20    //Schéma
21    for p=1:P
22        for j=2:J
23            n(j)=v(j) - f*(v1(x(j))*v(j)-v1(x(j-1))*v(j-1))
24        end
25    end
26 endfunction
27
28 [n,x,P]=trans(10000,100);
29 plot2d(x,n(:,2));

```


C.5 Implémentation schéma numérique de splitting pour terme de transport + sélection

```

1  h=6.5;
2
3  function [n,x,t,rho]=seltrans(N,T,O)
4      dt=T/N;
5      t=0:dt:T;
6      N=length(t);
7
8      dx=2*dt*abs(v3(0.005));
9      x=[0.005:dx:0.347];
10     y=x;
11     J=length(x);
12
13
14     n=[];
15     v=[];
16     rho=[];
17
18     //Initialisation du schéma par la condition initiale uini2
19     for j=1:J
20         v(j)=uini2(x(j));
21     end
22
23     f=dt/dx;
24
25     //Schéma
26     for p=1:N
27         v(1)=0; //Dirichlet
28         for j=2:J
29             n(j)=v(j) - f*(v3(x(j))*v(j)-v3(x(j-1))*v(j-1))
30         end
31         v=n;
32         for j=1:J
33             f=dx*sum(psi2(x(j),y,O)*v(:))
34             n(j)=[ (1+dt*max(0,r3(x(j),O)-f-d(x(j),h))) / (1+dt*max(0,-r3(x(j),O)+f+d(x(j),h))) ]*v(j)
35         end
36         v=n;
37         rho(p)=dx*sum(v(:))
38         if p==int(N/2) then
39             plot2d(x,n(:),2)
40         end
41     end
42 endfunction

```

```
43  
44 [n,x,t,rho]=seltrans(20000,100,5)  
45 plot2d(t,rho,2)
```

Références

- [1] F. Calvo M. Pérez-García B. Mendoza-Juez, A. Martínez-González. A mathematical model for the glucose-lactate metabolism of in vitro cancer cells. *Bull Math Biol*, 2012, 1125-1142.
- [2] Elsdén S. R. Bauchop T. The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.*, 23, 457-469, 1960.
- [3] Sébastien Benzekry. Contributions in mathematical oncology : When theory meets reality. *HDR*, 2017.
- [4] Cori and Cori. The carbohydrate metabolism of tumors ii. changes in the sugar, lactic acid, and co-combining power of blood passing through a tumor. *J Biol Chem* 65(2) :397-405, 1925.
- [5] Robert A. Gatenby. Curtis A. Gravenmier, Miriam Siddique. Adaptation to stochastic temporal variations in intratumoral blood flow : the warburg effect as a bet hedging strategy. *Bull Math Biol*, 2017.
- [6] Chang C-H et al. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. *Cell.*, 2015.
- [7] HJ Park et al. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *British Journal of Cancer*, 1999.
- [8] Jiang et al. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol Cell Physiol* 271(4) :C1172-C1180, 1996.
- [9] Pfeiffer T et al. Cooperation and competition in the evolution of atp-producing pathways. *Science* 292(5516) :504-507, 2001.
- [10] Pierre Sonveaux et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.*, 2008.
- [11] Robert A. Gatenby and Robert J. Gillies. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews. Cancer*, 2004.
- [12] Semenza GL. Targeting hif-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3 : 721-32, 2003.
- [13] Albert Goldbeter. Au coeur des rythmes du vivant. la vie oscillatoire. 2018.
- [14] J. Pouyssegur J. Chiche, M. Christiane Brahimi-Horn. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis : a common feature in cancer. *J. Cell Mol. Med. Vol 14, No4*, 2010.
- [15] Raghavan D Lindner D. Intra-tumoral extra-cellular pH : a useful parameter of response to chemotherapy in syngeneic tumour lines. *Br J Cancer* 100 : 1287-91.

- [16] Oense M. Neijssel and M. Joost Teixeira de Mattos. The energetics of bacterial growth : a reassessment (microreview). *Molecular Microbiology*, 1994, 179-182.
- [17] Warbourg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*; 124 : 269-70, 1956.
- [18] Benoît Perthame. Transport equations in biology. 2007.
- [19] Benoît Perthame. Some mathematical models of tumor growth. 2016.
- [20] Camille Pouchol. Modelling interactions between tumour cells and supporting adipocytes in breast cancer. 2015.
- [21] Edward T. Gawlinski. Robert A. Gatenby. The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion : Insights through mathematical models. *Cancer Research.*, 2001.
- [22] Angela M.Poff Thomas N.Seyfried, Roberto E.Flores and Dominic P.D'Agostino. Cancer as a metabolic disease : implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis vol.35 no.3 pp.515-527*, 2014.
- [23] AC Williams. An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis. *Oncogene*, 18 :3199-3204, 1999.